DIE THERMISCHE UND OSMOTISCHE REGULATION DER SACCHAROSE-BIOSYNTHESE IN DUNALIELLA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Müller
aus Nagold

1977

77 545

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0034

DIE THERMISCHE UND OSMOTISCHE REGULATION DER SACCHAROSE-BIOSYNTHESE IN DUNALIELLA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Müller
aus Nagold

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.9.1977

Dekan: Professor Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter: Universitätsdozent Dr. K. Wegmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Metzner

INHALTSVERZEICHNIS

Verwendete Abkürzungen	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	3
2.1. Zellmaterial und Kulturbedingungen	3
2.2. Bestimmung der Zellkonzentration und des Naßvolumens	4
2.3. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	4
2.4. $^{14}CO_2$-Fixierungsexperimente	5
2.4.1. Einbau des radioaktiven Kohlenstoffs	5
2.4.2. Extraktion der Algen	6
2.4.3. Dünnschichtelektrophorese und -Chromatographie der Algenextrakte	6
2.4.4. Autoradiographie und Radioaktivitätsbestimmung	7
2.5. Identifizierung der markierten Saccharose	9
2.6. Enzymatische Bestimmung von Glycerin und Saccharose	10
2.7. Bestimmung der Na^+-Konzentration der Zellen	13
2.8. Versuche zur Chloroplasten-Isolierung aus Dunaliella	14
2.8.1. Zellaufschluß	14
2.8.2. Dichtegradient	16
2.8.3. Elektronenmikroskopie	17
2.9. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Saccharose-P-Synthetase (E.C.2.4.1.14)	18
2.9.1. Zellaufschluß	18
2.9.2. Ammoniumsulfat-Fraktionierung	19
2.9.3. Ionenaustauschchromatographie	19
2.9.4. Gelchromatographie	20
2.9.5. Gelelektrophorese	21
2.9.6. Proteinbestimmung	22
2.9.7. Test zur Bestimmung der Aktivität der Saccharose-P-Synthetase	23

2.10. ESR-Messungen mit Spin-markierten Zellen 26
2.10.1. Spin-Label 26
2.10.2. Einbau des Spin-Label 26
2.10.3. Aufnahme der ESR-Spektren 27
2.11. Puffer, Lösungen und Reagenzien 28
2.12. Chemikalien 28

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE 30
3.1. Temperaturabhängigkeit des ^{14}C-Einbaumusters bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen im Nährmedium 30
3.2. Kinetik der Saccharose- und Glycerinsynthese 35
3.3. Osmotische Regulation der Saccharose-Synthese 38
3.4. Kinetik der Saccharose-Synthese im Licht und Dunkeln 39
3.5. Einfluß der Dunkelzeit auf die Saccharose-Synthese 41
3.6. Glycerinausscheidung der Zellen 42
3.7. Bestimmung der Na^+-Konzentration der Zellen 44
3.8. Versuche zur Chloroplasten-Isolierung aus Dunaliella 46
3.9. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Saccharose-P-Synthetase (E.C.2.4.1.14) 49
3.9.1. Isolierung und Reinigung 49
3.9.2. Einfluß der Enzymkonzentration und von Cofaktoren auf die Enzymaktivität 55
3.9.3. Einfluß der Substratkonzentrationen 56
3.9.4. Temperaturabhängigkeit der gereinigten Enzymfraktionen 63
3.9.5. Einfluß von NaCl auf die Enzymaktivität 64
3.10. ESR-Messungen an Spin-markierten Dunaliella-Zellen 65

4. DISKUSSION 72

4.1. Physiologie der Saccharose-Synthese in Dunaliella 72
4.2. Biosynthesewege der Saccharose in Dunaliella 75
a) Im Licht 75
b) Im Dunkeln 78
4.3. Ort der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella 79
4.4. Eigenschaften der Saccharose-P-Synthetase 82
a) Substratregulation 82
b) Einfluß von Temperatur und NaCl-Konzentration 84
4.5. Membran-Eigenschaften der Dunaliella-Zellen 86
4.6. Regulation der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella 89

5. ZUSAMMENFASSUNG 94

6. LITERATURVERZEICHNIS 96

Verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	N, N' - Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
DDSA	Dodecenylbernsteinsäure anhydrid (Epon-Härter)
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DMP - 30	2,4,6- Tri (dimethylaminomethyl) phenol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspin - Resonanz
MNA	Methylnadic anhydrid (Epon-Härter)
NADP	Nicotinamiddinucleotidphosphat
PER	Ammoniumperoxydisulfat
POPOP	1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-Benzol
PPO	2,5 - Diphenyloxazol
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethyläthylendiamin
TRICIN	N - Tris (hydroxymethyl) methylglycin
TRIS	Tris (hydroxymethyl aminomethan
UDPG	Uridin -5' - diphosphoglucose

1. EINLEITUNG

Die Saccharose ist seit langem als frühes Photosyntheseprodukt in Grünalgen bekannt.
Über ihre Bedeutung und die Regulation ihrer Biosynthese in diesen Organismen liegen jedoch kaum Daten vor.
Von WEGMANN (1968) wurde in der einzelligen, salztoleranten Grünalge Dunaliella (Klasse: Volvocales) ein beträchtlicher Einbau des photosynthetisch fixierten CO_2 in Saccharose nachgewiesen. Nach wenigen Minuten Photosynthese stellt es neben Glycerin ein Hauptprodukt des Stoffwechsels dar.
Seit von CRAIGIE und MC LACHLAN (1964) das Auftreten von großen Mengen an freiem Glycerin in Dunaliella gefunden wurde, war vor allem diese Stoffwechselbesonderheit des Organismus das Objekt weiterer Untersuchungen.
Von WEGMANN (1971) wurde eine osmotische Regulation der Glycerinsynthese nachgewiesen. Der relative Anteil, des während der Photosynthese in das Glycerin eingebaute $^{14}CO_2$ nimmt mit steigendem osmotischen Druck des Nährmediums zu.
Nachfolgende Untersuchungen von FRANK (1972) ergaben hinsichtlich der Abhängigkeit des $^{14}CO_2$ -Einbaumusters von der NaCl-Konzentration keine Hinweise mehr auf einen nennenswerten Anteil der Saccharose am Gesamtstoffwechsel von Dunaliella.

Auch nach Berichten anderer Autoren (CRAIGIE et al., 1966, STEWART, 1974, WINKENBACH et al., 1972) ist Saccharose in Dunaliella ein Stoffwechselprodukt von untergeordneter Bedeutung.

In Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit ergab sich bei ^{14}C-Einbauversuchen durch eine unbeabsichtigte Veränderung der Versuchsbedingungen ein hoher Einbau in Saccharose und ein deutlicher Hinweis auf eine Temperaturabhängigkeit dieser Synthese.

Die vorliegende Arbeit geht deshalb von der Fragestellung aus,

welche physiologischen Bedingungen die Saccharose-Synthese in Dunaliella beeinflussen. Dazu wurde neben dem Einfluß der Temperatur auch die Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Nährmediums untersucht.

Zur Aufklärung des Regulationsvorganges wurde ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung des Schlüsselenzyms der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella, der Saccharose-P-Synthetase entwickelt, um am gereinigten Enzym die im ersten Teil der Arbeit gefundenen physiologischen Einflüsse zu überprüfen und die Eigenschaften des Enzyms nachzuweisen.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Elektronenspinresonanz-Messungen an Spin-markierten Dunaliella-Zellen.

Sie sollen Aufschluß darüber geben, ob die Membran eines Dunaliella-Zellkompartimentes thermischen oder osmotisch bewirkten Strukturveränderungen unterliegt und damit möglicherweise ein membrangesteuerter Regulationsprozess vorliegt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellmaterial und Kulturbedingungen

Als Versuchsobjekt diente Dunaliella spec. (Stamm 19-6 der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen).
Die Algen wurden in Kulturröhren von 40 cm Höhe und 4 cm lichter Weite übergeimpft und zur Dauerkultur in einen Lichtthermostaten gebracht, dessen Wasserbad,(wenn nicht anders vermerkt) eine Temperatur von 25°C hatte. Die Begasung erfolgte durch ein Gemisch aus 98 Vol % Preßluft und 2 Vol % CO_2 , das von unten in die Kulturröhre eingeleitet wurde.
Die Beleuchtung der Kulturen erfolgte durch 3 Leuchtstoffröhren vom Typ OSRAM 40 W/25 und 2 Leuchtstoffröhren vom Typ OSRAM 40 W/15. Die Beleuchtungsintensität an der Oberfläche der Kulturröhren betrug 8000 Lux (gemessen mit einem Standard Lux-Meter der Fa. Lange, Berlin).

Das Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	0,33 - 2,0 M (entsprechend 2 - 12 % NaCl)
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	44,0 mM
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	10,0 mM
KNO_3	10,0 mM
KH_2PO_4	0,15 mM

Spurenelemente wurden aus einer Stammlösung auf folgende Endkonzentrationen zugegeben:

NaFe-EDTA	15,0 /uM
H_3BO_3	185,0 /uM
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	7,0 /uM
$ZnCl_2$	0,8 /uM
$Co(NO_3)_2 \times 6\ H_2O$	0,02/uM
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,2 nM

Das autoklavierte Nährmedium hatte einen pH-Wert von ca. 6,0.

Strenge Sterilität war auf Grund der hohen Salzkonzentrationen des Mediums nicht erforderlich.
Die Algenkulturen wurden mit einer relativen Zellzahl von etwa 100 in einem Volumen von 200 ml Nährmedium pro Kulturröhre angeimpft. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (nach 5 bis 7 Tagen) wurden 10 ml der dichtgewachsenen Kultur (RZZ ca. 2000) auf Kulturröhren mit frischer Nährlösung übergeimpft und damit wieder auf die Ausgangszellzahl gebracht.
Für die Experimente wurden nur Algen aus Kulturen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, also bis zum 5. Tag. Die Vermehrungsrate lag unter den gewählten Kulturbedingungen bei etwa einer Zweiteilung pro Tag.

2.2. Bestimmung der Zellkonzentration und des Naßvolumens

Die Zellzahl wurde nach Auszählung der Zellen mit einer Blutkörperchenzählkammer 'Thoma neu' bestimmt. Als 'relative Zellzahl (RZZ) wird die Zahl an Zellen bezeichnet, die man beim Auszählen einer Probe mit der Zählkammer erhält. Einer RZZ 100 entspricht eine Zellkonzentration von $1{,}56 \times 10^6$ Zellen pro ml Algensuspension. Wegen der Beweglichkeit der begeißelten Dunaliella-Zellen wurden sie vor der Auszählung abgetötet. Dazu wurden zu 1 ml Suspension 0,1 ml einer 2 %igen Formaldehyd-Lösung zugegeben. Die Volumenänderung wurde rechnerisch berücksichtigt.
Das Naßvolumen der Zellen wurde mit Haematokrit-Röhrchen gemessen. Dazu wurden je 1 ml Suspension einpipettiert und 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert.

2.3. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Dazu wurden jeweils 5 ml Suspension abzentrifugiert und das Zellsediment mit 5 ml 85 %igem Aceton bei Raumtemperatur extrahiert. Das farblose Zellmaterial wurde abzentrifugiert und vom Acetonextrakt die Absorption bei 663 und 644 nm mit dem Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) gemessen. Die Konzentra-

tionen an Chlorophyll a und b wurden aus den gemessenen Extinktionen nach folgenden Beziehungen berechnet (METZNER et al., 1965):

$$c_{\text{Chlorophyll a}} = 10{,}3 \times E_{663} - 0{,}918 \times E_{644}$$

$$c_{\text{Chlorophyll b}} = 19{,}7 \times E_{644} - 3{,}87 \times E_{663}$$

Die Pigmentkonzentration erhält man dabei in /ug /ml Extrakt.

2.4. $^{14}CO_2$ - Fixierungsexperimente

2.4.1. Einbau des radioaktiven Kohlenstoffs

Algenkulturen am Beginn der logarithmischen Wachstumsphase , mit einer RZZ von etwa 500, wurden 2 Stunden vor Versuchsbeginn in frischem Nährmedium suspendiert. Für jedes Experiment wurden je 100 ml Suspension aus den Kulturröhren entnommen, abzentrifugiert, und in nur 6 ml Nährmedium aufgenommen, um eine hohe Zelldichte und möglichst hohe Fixierungsraten zu erreichen. Davon wurden 1 ml zur Chlorophyllbestimmung abgenommen. Mit den übrigen 5 ml Suspension wurde das Fixierungsexperiment in einem 25 ml Erlenmeyer-Kolben durchgeführt.
Zur Temperaturregulation diente ein Wasserbad, das an einen Thermostat angeschlossen war und sich in ständigem Durchfluß befand. Die Belichtung erfolgte durch eine 300 W Lampe (Philips Comptalux). Die Lichtintensität betrug 40 000 Lux. Zwischen Wasserbad und Lampe befand sich eine wasserdurchströmte Küvette, um während des Experiments eine möglichst hohe Temperaturkonstanz zu erreichen.
Vor Fixierungsbeginn wurde die Algensuspension bei der entsprechenden Temperatur 20 Minuten im Wasserbad vorbelichtet. Dann wurde der radioaktive Kohlenstoff als Natriumhydrogencarbonat zugesetzt (in wässriger Lösung, pH 8,0). Pro Fixierung wurden 200 /ul entsprechend 20 /uCi eingesetzt. Die Fixierungsdauer betrug jeweils 10 Minuten.

2.4.2. Extraktion der Zellen

Vor der Extraktion wurden die Algen durch Zentrifugation von dem Nährmedium abgetrennt, um bei der elektrophoretischen und chromatographischen Auftrennung der Extrakte eine Beeinträchtigung der Auftrennung durch die hohen Salzkonzentrationen zu vermeiden.

1. Extraktion: Mit 20 ml siedendem Äthanol (diente gleichzeitig zur Abtötung der Zellen)
2. Extraktion: Mit 10 ml 50 %igem Äthanol
3. Extraktion: Mit 10 ml dest. H_2O

Es wurde jeweils 15 Min. extrahiert und nach jeder Extraktion wurden die Zellrückstände abzentrifugiert. Die vereinigten Extrakte (je 40 ml) wurden dann im Rotationsverdampfer bei max. 60°C sofort zur Trockne eingeengt und in 500 µl dest. H_2O aufgenommen.

2.4.3. Dünnschichtelektrophorese und Chromatographie der Algenextrakte

Die Extrakte wurden mit einer von SCHÜRMANN (1969) entwickelten Kombination von Dünnschichtelektrophorese (1. Dimension) und Dünnschichtchromatographie (2. Dimension) aufgetrennt. Verwendet wurden dazu Celluloseplatten (20 x 20 cm) mit einer Schichtdicke von 0,5 mm. Das Beschichtungsmaterial wurde hergestellt aus:

- 15 g Cellulose MN 300
- 85 ml dest. H_2O
- 1 ml 0,1 m EDTA-Lösung.

Nach Beschichtung wurden die Platten bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet.
Von jedem Extrakt wurden 5 µl mit einer Mikropipette (Fa. Pedersen, Kopenhagen) in die linke untere Ecke, 3 cm von den Kanten der Platte entfernt, punktförmig aufgetragen.
Vor der Elektrophorese wurden die Platten mit Pyridin-Essigsäure-Puffer (pH 4,0) besprüht und anschließend sofort der Elektrophorese bei 700-800 V (20-30 mA) 50 Minuten bei 0°C

unterworfen. Nach anschließendem Trocknen der Platten wurde die Chromatographie im Fließmittel: Butanol (2)- Ameisensäure - Wasser (6:1:2) (METZNER, 1962) durchgeführt. Zur besseren Auftrennung der langsam wandernden Substanzen diente ein zweifacher Lauf: Nach einer Laufstrecke des Fließmittels von 12 cm wurden die Platten getrocknet und erneut im gleichen Fließmittel bis zu einer Laufstrecke von 19 cm chromatographiert.

2.4.4. Autoradiographie und Radioaktivitätsbestimmung

Zum autoradiographischen Nachweis der durch Dünnschichtelektrophorese und -chromatographie aufgetrennten ^{14}C-markierten Photosyntheseprodukte wurden Röntgenfilme auf die Celluloseschicht der Platten gelegt. Nach lichtdichter Verpackung wurden die mit Film belegten Platten mehrere Tage im Dunkeln exponiert. Danach wurden die Filme photographisch entwickelt. Die radioaktiv markierten Substanzen, die mit Hilfe der Autoradiographie als Schwärzungsstellen auf den Röntgenfilmen sichtbar gemacht wurden, wurden durch ein im Institut für Chemische Pflanzenphysiologie erarbeitetes Verteilungsmuster identifiziert (siehe Abb. 1).
Zur Messung der Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffs auf die einzelnen Substanzflecken des Chromatogramms,wurden diese direkt auf der Celluloseschicht markiert. Dazu wurde zunächst das Schwärzungsmuster der Röntgenfilme auf Transparentpapier übertragen und von diesem auf die Celluloseschicht mit Bleistift durchgedrückt. Daraufhin wurden die auf der Schicht markierten Bereiche mit einem Spatel ausgekratzt, abgesaugt und in 20 ml Plastikfläschchen überführt. Für die anschließende Radioaktivitätsbestimmung in einem Flüssigkeits-Szintilationszähler (Beckmann DPM 100) wurden die Proben mit je 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit nach SNYDER (1964) vermischt. Die Messdauer im Zähler betrug zwischen 2 und 10 Min., bei einem Fehler von maximal 2 %. Gemessen wurde die Zahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute (DPM).

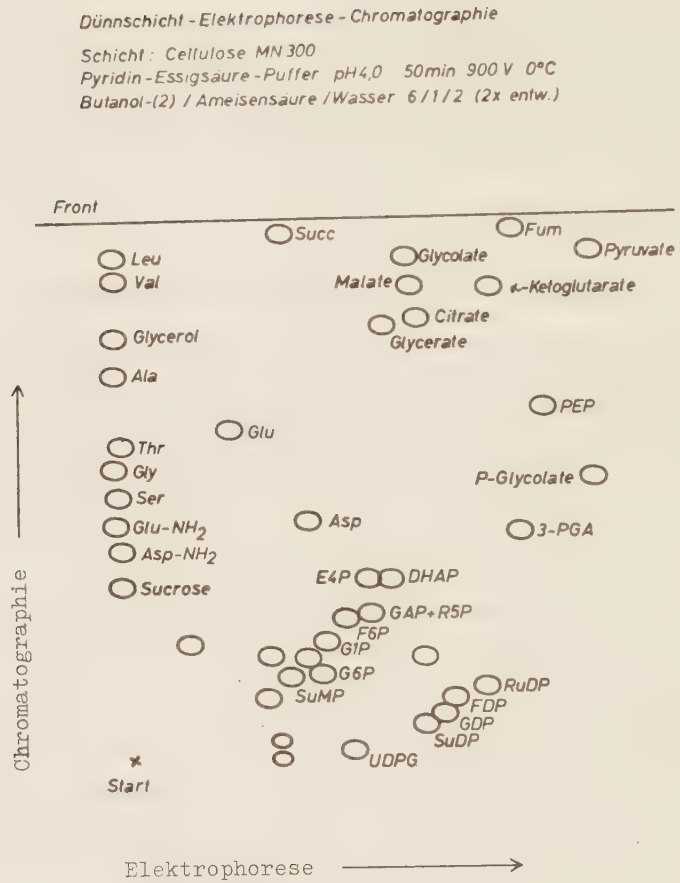


Abb. 1: Verteilungsmuster von Photosyntheseprodukten nach zweidimensionaler Trennung durch Dünnschicht-Elektrophorese und -Chromatographie.
(Erarbeitet im Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen)

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität der Algenextrakte wurden je 5 - 20 µl der Proben in Plastikfläschchen pipettiert, zur Entfernung des verbliebenen anorganischen, nicht eingebauten radioaktiven Kohlenstoffs mit einem Tropfen konz. Ameisensäure vermischt und im N_2-Strom eingedampft. Nach Zugabe von je 10 ml Szintillationsflüssigkeit erfolgte wiederum die Radioaktivitätsbestimmung im Szintillationszähler.

2.5. Identifizierung der markierten Saccharose

Dazu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

a) Anreicherung und Hydrolyse der ^{14}C - markierten Substanz:
Hierzu wurde der Gesamtextrakt eines Versuches mit hohem Anteil der unbekannten Substanz zuerst durch 1-dimensionale Dünnschichtchromatographie (Fließmittel: Butanol (2)-Ameisensäure-Wasser, 6:1:2) aufgetrennt, nach Autoradiographie die Flecken der unbekannten Substanz aus der Zelluloseschicht ausgekratzt und mit dest. H_2O eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend der Dünnschichtelektrophorese und -chromatographie unterworfen, um die restlichen Verunreinigungen abzutrennen. Dann wurde die obige Prozedur wiederholt, das eingeengte Eluat (40 µl) in ein Hydrolyseglăschen gefüllt und mit 1 ml 1 n HCL 1 Std. bei 105 ^{o} C im Trockenschrank hydrolysiert.

b) Co-Chromatographie des Hydrolysats mit D-Glucose und D-Fructose:
Das ^{14}C - markierte Hydrolysat wurde dazu einer 2-dimensionalen Dünnschicht-Co-Chromatographie mit D-Glucose und D-Fructose unterworfen, die eine gute Auftrennung der Zucker erlaubte:
1. Dimension: Fließmittel: Butanol (1) - Aceton - Diäthylamin - H_2O (10:10:2:5).
2. Dimension: Fließmittel: Butanol (2) - Ameisensäure - Wasser (6:1:2) (METZNER 1962).
Nach Trocknen der Platte wurde die Zelluloseschicht zur Anfärbung der aufgetrennten Zucker mit Anisidinphosphat besprüht.

c) Enzymatische Spaltung der Substanz durch ß-Fructosidase (Invertase):
Die durch Dünnschichtelektrophorese und -chromatographie angereicherte und gereinigte Substanz wurde nach Elution aus der Celluloseschicht und Einengung im Rotationsverdampfer in 500 µl dest. H_2O aufgenommen.
Die enzymatische Spaltung mit Invertase wurde in folgendem Testansatz durchgeführt:
- 200 µl Probelösung
- 100 µl 0,1 m Acetat-Puffer, pH 4,6
- 100 µl Invertaselösung (2 mg/ ml)

Der Ansatz wurde 15 Min. bei 55°C inkubiert. Nach Abtrennung des hitzedenaturierten Enzyms wurde die Lösung zur Trockne eingeengt, in 50 µl dest. H_2O aufgenommen und der 2-dimensionalen Dünnschichtchromatographie unterworfen. Anschließend erfolgte der autoradiographische Nachweis der aufgetrennten Produkte.

2.6. Enzymatische Bestimmung von Glycerin und Saccharose

Zur Bestimmung des Glycerin- und Saccharosegehalts der Zellen wurden jeweils 20 oder 40 ml Suspension aus der Kultur entnommen, bei 1500 g 5 Min. zentrifugiert und das Sediment in 2 oder 4 ml dest. H_2O aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde unter Kühlung der Ultraschallbehandlung unterworfen (Branson Sonifier, 5 Amp., 2 x 30 Sek.), die Zellfragmente durch Zentrifugation (100 000 g, 15 Min.) abgetrennt und der zellfreie Extrakt bis zur Durchführung der enzymatischen Tests eingefroren.
Für die Bestimmung der Glycerinausscheidung in das Nährmedium wurde der nach Zentrifugation der 20 oder 40 ml Suspension erhaltene, klare Überstand verwendet.

2.6.1. Glycerin-Bestimmung

Die Glycerinmenge in den Extrakten wurde mit der Biochemica

Test-Kombination 'Glycerin und Neutralfett' (Boehringer Mannheim) bestimmt. Der Test beruht auf folgenden Reaktionen:

a) Glycerin wird in der durch die Glycerokinase katalysierten Reaktion durch ATP zu Glycerin-1-P phosphoryliert:

$$\text{Glycerin} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glycerin-1-P} + \text{ADP}$$

b) Mittels der Pyruvatkinase wird das entstandene ADP mit Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt:

$$\text{PEP} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$

c) Pyruvat wird durch NADH mittels Lactat-Dehydrogenase zu Lactat hydriert, wobei NADH zu NAD^+ oxydiert wird:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + NAD^+$$

Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Glycerinmenge äquivalent. NADH ist Meßgröße und wurde auf Grund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt (Zeiss Spektralphotometer PMQ II). Aus der Extinktionsdifferenz vor und nach Stillstand der Reaktion läßt sich die Glycerinkonzentration nach folgender Formel berechnen:

$$\Delta E_{340} \times 9{,}3 = \text{mg Glycerin / 100 ml Extrakt}$$

Um die Extinktionsdifferenz von 0,8 nicht zu überschreiten, wurden in der Regel die Extrakte 50-fach, Proben des Nährmediums 10-fach verdünnt. Die errechneten Werte wurden dann mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.6.2. Saccharose-Bestimmung

Die Saccharosemenge in den Extrakten wurde mit dem 'UV-Test zur Bestimmung von Saccharose und Glucose in Lebensmitteln' (Boehringer Mannheim) bestimmt.
Der Test erfolgt nach dem Prinzip, daß der Glucosegehalt vor und nach enzymatischer Hydrolyse der Saccharose bestimmt wird.

a) Glucose-Bestimmung

1) Das Enzym Hexokinase (HK) katalysiert bei pH 7,6 die Phosphorylierung von Glucose mit ATP:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{Glucose-6-P} + \text{ADP}$$

2) Das entstandene Glucose-6-P wird durch NADP in Gegenwart von Glucose-6-P-Dehydrogenase (G6P-DH) spezifisch zu Gluconat-6-P oxidiert, wobei NADPH entsteht:

$$\text{Glucose-6-P} + \text{NADP} \xrightleftharpoons{\text{G6P-DH}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

b) Enzymatische Inversion

3) Saccharose wird durch das Enzym ß-Fructosidase (Invertase) bei pH 4,6 zu Glucose und Fructose hydrolysiert:

$$\text{Saccharose} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{Invertase}} \text{Glucose} + \text{Fructose}$$

Die Glucose-Bestimmung erfolgt in demselben Ansatz nach obigem Prinzip. NADPH ist dabei der Glucosemenge äquivalent und wurde auf Grund seiner Absorption bei 340 nm gemessen.
Aus der Differenz der Extinktionen vor und nach Stillstand der Reaktion erhält man:

$$\Delta \text{ E Glucose (vor Inversion)}$$
$$\Delta \text{ E Gesamtglucose (nach Inversion)}$$

Die Differenz dieser Werte ergibt Δ E Saccharose.
Daraus läßt sich nach der Formel:

$$\Delta \text{E Saccharose} \times 1{,}662 = \text{mg Saccharose/ml Extrakt}$$

die Saccharose-Konzentrationen der Extrakte berechnen.
Der Formel liegt ein Probevolumen von 0,1 ml zugrunde.
Da die Glucosekonzentrationen vor Inversion bei allen gemessenen Proben nur bei 0,5 - 1 % der Gesamtglucose-Konzentrationen, und damit zumeist an der Empfindlichkeitsgrenze des Testes lagen, wurde bei der Hälfte der Proben auf diese Bestimmung aus Kostengründen verzichtet.

2.7. Bestimmung der Na^+- Konzentration der Zellen

2.7.1. Abtrennung des stark NaCl-haltigen Nährmediums von den Zellen

Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden auf ihre Eignung hin getestet:

a) Waschen der Zellen mit isotonischer Glycerin-Lösung

20 - 50 ml Zellsuspension wurden abzentrifugiert und zwei Mal mit 20 ml isotonischer Glycerin-Lösung gewaschen. Das Zellsediment wurde daraufhin mit 2 ml 6 n HCl hydrolysiert, 1 Std. bei 100°C, das Hydrolysat im Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und in 10 ml dest. H_2O aufgenommen.

b) Zentrifugation der Zellen in ein Gemisch von Petrolbenzin-Tetrachlorkohlenstoff

Das organische Gemisch mußte in seiner Dichte so gewählt werden, daß auch bei Zentrifugation das Nährmedium (mit 2, 6 und 12 % NaCl) nicht eindringen, die Zellen jedoch aus dem wässrigen Nährmedium heraus, durch das Gemisch hindurch sedimentiert werden konnten.
Es wurden folgende, für die einzelnen Nährmedien dafür günstige Mischungsverhältnisse gefunden und für die Zentrifugation eingesetzt:

NaCl-Gehalt des Nährmediums	Petrolbenzin ml	CCl_4 ml
2 %	18,5	11,5
6 %	17,0	13,0
12 %	15,0	15,0

Jeweils 10 ml der Zellsuspension wurden vorsichtig in einem 40 ml - Zentrifugenbecher auf das Gemisch aufgeschichtet und sofort bei 18 000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Anschlie-

ßend wurden die ca. 10 ml Nährmedium sofort abgehebert, der Becherrand von jeglicher wässriger Lösung gereinigt und das organische Gemisch sofort abgeschüttet.
Das verbliebene Zellsediment wurde in 5 ml dest. H_2O suspendiert und dadurch die Zellen aufgebrochen. Nach Zentrifugation wurde ein zellfreier Überstand erhalten.

2.7.2. Messung der Na^+- Konzentrationen der Zellextrakte

Die Messungen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer (PMQ II) mit Flammenphotometer-Zusatz durchgeführt. Zur Anregung diente eine H_2/O_2- Flamme, gemessen wurde die Emission der 590 nm Natrium-Linie.
Eine Eichkurve mit NaCl-Konzentrationen von 0 - 2 mM ermöglichte die direkte Bestimmung der Na^+- Konzentrationen der Zellextrakte.

2.8. Versuche zur Chloroplasten-Isolierung aus Dunaliella

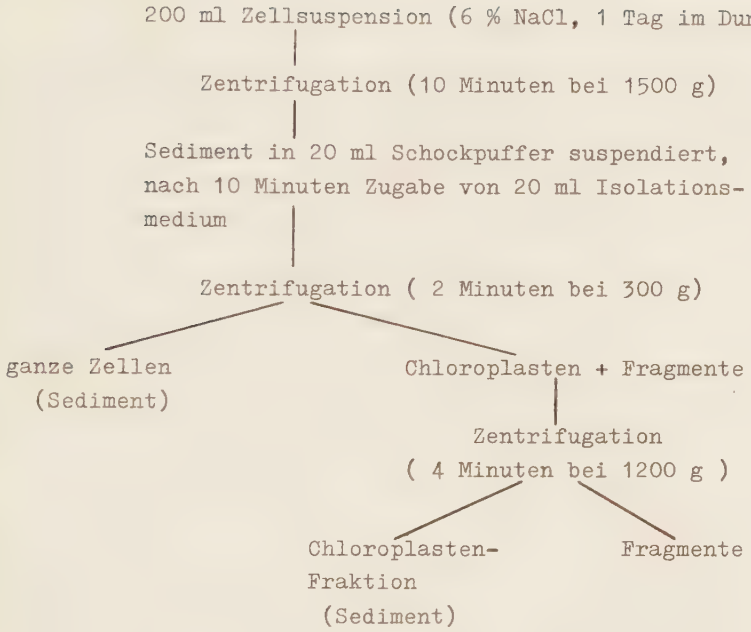
2.8.1. Zellaufschluß

Es wurden zwei Methoden für den Aufschluß der Zellen angewandt:

a) Osmotischer Schock

Schockpuffer : 50 mM Tricin-NaOH, pH 8,0
Isolationsmedium :
50 mM Tricin-NaOH, pH 8,0
800 mM Sorbit
25 mM NaCl
2,5 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O
1,2 mM $MnCl_2$ x 4 H_2O
1 mM EDTA
0,2 % BSA

Der Zellaufschluß und die danach angewandte Differentialzentrifugation wurden nach folgendem Schema durchgeführt:



b) Homogenisation mit dem Sorvall Omni-Mixer

Isolationsmedium : 50 mM Tricin-NaOH, pH 7,5
330 mM Sorbit
100 mM NaCl
10 mM KCl
1 mM $MgCl_2$, $MnCl_2$, EDTA
1 % BSA, Ficoll

70 ml Zellsuspension (6 % NaCl) wurden 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und das Zellsediment in 7,5 ml Isolationsmedium aufgenommen. Die Homogenisation erfolgte mit dem Sorvall Omni-Mixer 3 x 20 sec unter Eiskühlung.

2.8.2. Ludox - Dichtegradient

a) Reinigung von Ludox AM

Ludox AM, das einen Anteil von ca. 40 % SiO_2 besitzt, wurde nach folgender Prozedur in Anlehnung an MORGENTHALER et al. (1974) gereinigt:

- 100 ml des Sols werden mit wenigen Spatelspitzen Dowex 50 x 8 (H-Form) unter Rühren auf pH 7,5 gebracht
- Das Ionenaustauscher-Harz wird durch mehrmaliges Zentrifugieren abgetrennt
- Zugabe von 2,5 gr Aktivkohle unter Rühren der Mischung (über Nacht)
- Vollständiges Entfernen der Aktivkohle durch Zentrifugation und mehrmalige Filtration

b) Präperation des Gradienten

Das gereinigte Ludox wurde mit dem doppelt konzentrierten Isolationsmedium b) 1:1 verdünnt. Mit diesem 50 %-igen Ludox und Isolationsmedium b) wurden 20, 25, 30, 35 und 40 %-ige (v/v) Ludox-Lösungen für den diskontinuierlichen Gradienten hergestellt.
Je 3 ml von jeder Gradienten-Lösung wurden in einem 20 ml-Zentrifugenglas vorsichtig übereinander geschichtet.

c) Zentrifugation

Nach Auftragen von je 2,5 ml Zellhomogenat pro Gradient wurde sofort bei 1500 g und 4°C 20 Minuten zentrifugiert (Christ-Tischzentrifuge mit Ausschwingrotor).
Die einzelnen Banden wurden vom Boden des Zentrifugenglases her, mit einem dünnen Glasrohr durch eine Schlauchpumpe langsam abgesaugt.
Die lichtmikroskopische Kontrolle der einzelnen Banden erfolgte im Phasenkontrast bei 1250-facher Vergrößerung.

2.8.3. Elektronenmikroskopie+

a) Fixierung

Je 1 ml der zu untersuchenden Bande (bzw. einer Zellsuspension) wurden mit 1 % Glutaraldehyd im Isolationsmedium b) (ohne BSA und Ficoll),(bzw. im Nährmedium beim Kontrollversuch mit ganzen Zellen) bei 4°C 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Fraktionen 3 x 10 Minuten mit dem Isolationsmedium bei 4°C gewaschen und mit 2 % OsO_4 nachfixiert.

b) Entwässerung

Sie erfolgte (ebenfalls bei 4°C) in folgender Reihenfolge:

- 50 %, 70 % Äthanol (jeweils mit 0,33 m Sorbit)
- 85 % Äthanol (0, 15 m Sorbit)
- 95 % Äthanol und abschließend zwei Mal absoluter Äthanol

Zwischenmedium : 2 x 15 Minuten Propylenoxid

c) Einbettung

Das Einbettungsgemisch bestand aus:

Epon 812	16 g
DDSA	8,016 g
MNA	8,68 g
DMP-30	0,40 g

Infiltrationsstufen : 1) Epon : Propylenoxid 1:1
2) Epon : 1 Std.
3) Epon : 1 Std.

Die Polymerisation wurde 12 Stunden bei 45°C und 24 Stunden bei 60°C durchgeführt.

+Für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich herzlich Herrn Dr. Bardele und Frl. Vees, Institut für Biologie III, der Universität Tübingen.

d) Schneiden der Präperate

Schneidegerät: Ultramikrotom (LKB) mit Diamantmesser

e) Schnittkontrastierung

Uranylacetat (gesättigte Lösung) : 20 Minuten
Bleicitrat (nach Reynolds) : 7 Minuten

f) Elektronenmikroskopische Aufnahme

Die Aufnahmen wurden durchgeführt mit den Geräten Siemens 102 und Siemens 1, bei jeweils 60 kV Beschleunigungsspannung.

2.9. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Saccharose-P-Synthetase (E.C.2.4.1.14)

2.9.1. Zellaufschluß

Als Ausgangsmaterial dienten Zellkulturen, die in einem Nährmedium mit 12 % NaCl angezogen wurden.
Für jede Aufarbeitung wurden 1200 ml Algenkultur am 4. - 5. Tag durch Zentrifugation geerntet (15 Minuten bei 1500 g, Sorvall GSA-Rotor). Dies ergab jeweils eine Gesamtzellmenge von ca. 28 x 10^9 Zellen, entsprechend 8 - 9 g Naßgewicht der Zellfragmente.
Die geernteten Zellen wurden zwei Mal durch Zentrifugation (bei 1500 g, 10 Minuten) mit 2 M NaCl in 10 mM Tricin-NaOH pH 7,7 bei Raumtemperatur gewaschen.
Das Sediment wurde mit 10 mM Tricin-NaOH pH 7,7, 1 mM EDTA, bei $4^{\circ}C$ 20-fach verdünnt, sodaß eine NaCl - Endkonzentration von etwa 100 mM erreicht wurde. Durch diesen osmotischen Schock wurden die Zellen aufgebrochen.
Die Zellfragmente wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 38 000 g abgetrennt (je 20 Minuten, Sorvall SS-34 Rotor). Der zellfreie, gelbgefärbte Überstand enthielt die Saccharose-P-Synthetase - Aktivität.

2.9.2. Ammoniumsulfat - Fraktionierung

Zu dem zellfreien Extrakt (100 - 120 ml) wurde schrittweise unter konstantem Rühren festes puderförmiges Ammoniumsulfat bis zu einer 25 %-igen Sättigungskonzentration zugegeben (14,4 g /100 ml). Nach 30 Minuten bei weiterem konstanten Rühren wurde das gefällte Protein durch Zentrifugation (15 Minuten bei 38 000 g) abgetrennt und verworfen.
Zu dem Überstand wurde weiteres Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 45 % zugegeben (12,5 g /100 ml). Nach 15 Stunden (ohne Rühren) wurde die Suspension zentrifugiert und das erhaltene gelbe Sediment innerhalb von etwa 60 Minuten in einem Volumen von 2 ml Puffer A oder B gelöst.

Puffer A: 50 mM Na-Phosphat pH 7,5 , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA
Puffer B: 50 mM Na-Phosphat pH 8,0 , 10 mM NaCl, 1 mM EDTA

2.9.3. Ionenaustauschchromatographie

Zur Entfernung von NaCl, Ammoniumsulfat und eventuell mit ausgefällten Zuckern wurde die Proteinlösung über eine Sephadex G-25 - Säule (2 x 20 cm) entsalzt.
Das im Ausschlußvolumen von etwa 16 ml eluierte Protein wurde anschließend auf eine DEAE Cellulose - Säule (Whatman DE 52) gegeben, die mit dem jeweiligen Elutionspuffer äquilibriert war.
Zur Reinigung des Enzyms an der DEAE-Cellulose wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt:

A) Start-Puffer-Elution

Die in Puffer A entsalzte Proteinlösung wurde auf die DEAE-Cellulose - Säule (2 x 5 cm) gegeben und die unter diesen Bedingungen nicht an den Ionenaustauscher gebundene Saccharose-P-Synthetase im etwa 3-fachen Totvolumen mit Puffer A eluiert.

B) Gradienten-Elution

Die in Puffer B entsalzte Proteinlösung wurde auf die DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen (2 x 10 cm). Nach Elution

der nicht gebundenen Proteine mit 30 ml Puffer B wurde das adsorbierte Enzym mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 - 250 mM NaCl in Puffer B (200 ml Gesamtvolumen) von der Säule eluiert. Der Durchfluß wurde durch eine Pumpe konstant gehalten. Es wurden 6 - 10 ml Fraktionen gesammelt und auf Saccharose-P-Synthetase - Aktivität getestet.

2.9.4. Gelchromatographie

Die durch Ionenaustauschchromatographie erhaltenen aktiven Proteinfraktionen wurden mit Ammoniumsulfat ausgefällt (50 % Sättigungskonzentration) und nach Zentrifugation das Sediment in 0,5 - 2 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 (+ 0,5 mM EDTA), oder 50 mM Tricin-NaOH pH 7,5 (+ 0,5 mM EDTA) gelöst.

Diese Proteinlösungen wurden durch Gelchromatographie an Dextran- (Sephadex G-200, fine), oder Agarose-Gelen (Bio-Gel A 1,5 m) weiteraufgetrennt.

A) Auftrennung an Sephadex G-200:

1,6 x 35 cm Säule mit Adapter (K 16/40 Pharmacia-Säule)
Bed-Volumen: 70 ml
Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und auf Aktivität getestet.

B) Auftrennung an Bio-Gel A 1,5 m:

2,6 x 55 cm Säule mit Adapter (K 26/70 Pharmacia-Säule)
Bed-Volumen: 290 ml
Es wurden 4 - 6 ml Fraktionen gesammelt und auf Aktivität getestet.

Für sämtliche chromatographische Trennungen wurde zur automatischen Aufzeichnung der Transmission der Eluate bei 280 nm und zur automatischen Sammlung der Fraktionen ein Uvicord II in Verbindung mit Schreiber und Fraktionssammler der Firma LKB eingesetzt.
Bei einzelnen Versuchen wurde statt der abschließenden Gelfiltration an Sephadex G-200, bzw. Bio-Gel A 1,5 m eine ein-

fache Entsalzung an Sephadex G-25 vorgezogen (1 x 20 cm Säule), um eine zu starke Verdünnung der Lösungen zu vermeiden.

2.9.5. Gelelektrophorese

Zur Reinheitskontrolle und groben Molekulargewichtsbestimmung der gereinigten Enzymfraktionen wurde die Disc-Elektrophorese eingesetzt.
Dabei kam das DESAGA Gerätemodell 146300 für Flachgelelektrophorese mit einer Küvetten-Innengröße von 10 cm Länge, 8 cm Breite und 3 cm Gelstärke zur Anwendung.
Bei der Gelpräparation wurde nach der Vorschrift von MAURER (1971), Gelsystem Nr. 1 (S. 44) verfahren.
Die Stammlösungen, jeweils mit dest. H_2O auf 100 ml aufgefüllt, hatten folgende Zusammensetzung:

a) Sammelgel: 2 cm hoch, zur Einführung der Proben wurden mit einem Kamm Taschen eingestochen, die Polymerisation des Gels im Neonlicht war nach etwa 30 Min. abgeschlossen (an Trübung ersichtlich).
   Stammlösg. 1: Tris 5,98 g in 48 ml 1n HCl (pH 6,7)
   TEMED 0,46 ml
   Stammlösg. 2: Acrylamid 10 g
   BIS 2,5 g
   Stammlösg. 3: Riboflavin 4 mg
   Stammlösg. 4: Saccharose 40 g

b) Trenngel: 7 cm hoch, Polymerisation (chemisch) nach etwa 20 Minuten. Zum Schutz der Geloberfläche wurde vor der Polymerisation eine dünne Schicht dest. H_2O aufgebracht.
   Stammlösg. 5: Tris 36,3 g in 48 ml 1n HCl (pH 8,9)
   TEMED 0,23 ml
   Stammlösg. 6: Acrylamid 30 g
   BIS 0,735 g
   Stammlösg. 7: Peroxydisulfat 0,14 g

c) Pufferlösung: pH 8,3
Tris 6,0 g
Glycin 28 g mit dest. H_2O auf 1000 ml

Die Gesamtmenge an Puffer betrug im oberen und unteren Puffergefäß jeweils 1000 ml.

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 500 V (30 - 40 mA) drei bis vier Stunden durchgeführt, bis die Farbstoffbande (Bromphenolblau), die die Front anzeigt, am unteren Ende des Trenngels angelangt war.
Nach Abschluß der Elektrophorese erfolgte die Anfärbung der Proteinbanden durch Einlegen des Gels in eine 12,5 %-ige Trichloressigsäure-Lösung, die mit einigen Tropfen einer 0,25 %-igen Coomassie Brillant Blue G-250 Lösung versetzt wurde. Die Fixierungsdauer betrug etwa 20 Stunden. Zur anschließenden Entfärbung wurde das Gel in 5 %-iger Essigsäure gebracht und feucht eingeschweißt.
Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde als Vergleichsprotein Rinderserumalbumin gewählt, das durch Bildung von Dimeren, Trimeren etc. einen Molekulargewichtsbereich von 67 000 - 335 000 Daltons ergab.

2.9.6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von LOWRY et al. (1951) nach folgendem Testschema durchgeführt:

- 0,2 ml Proteinlösung (10 - 250 /ug/ml)
  0,2 ml 1 N NaOH
  2,0 ml alkalisches Cu-Reagenz
  10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- 0,2 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz schnell zugeben und gut durchmischen
- nach 30 Minuten Extinktion der Proben bei 720 nm gegen Leerwert (reiner Puffer anstelle der Proteinlösung) im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) messen.

Die Relativwerte der pflanzlichen Proteinkonzentration wurden an Hand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin als Standard ermittelt.

2.9.7. Test zur Bestimmung der Aktivität der Saccharose-P-Synthetase

Die Saccharose-P-Synthetase katalysiert folgende Reaktion:

UDPG + F-6-P $\rightleftharpoons$ Saccharose-6-P + UDP

Zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms während der Reinigung und bei der Untersuchung seiner Eigenschaften diente der optische Nachweis des gebildeten Saccharose-P nach der Resorcin-Methode von ROE (1934), mit Saccharose als Standard.

a) Zusammensetzung des Standard - Testansatzes

Der Ansatz enthielt in einem Testvolumen von 100 µl:

- 2,5 µM UDP-Glucose
- 0,5 µM F-6-P
- 1,5 µM $MgCl_2$
- 2,5 µM Tricin-NaOH, pH 7,5
- 50 µl Enzym-Lösung in
  - a) 50 mM Tricin-NaOH, pH 7,5 oder
  - b) 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5

Beim Test auf die Saccharose-Synthetase (E.C.2.4.1.13) wurde F-6-P durch Fructose in gleicher Konzentration ersetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 Minuten bei 37°C, bzw. 41°C in einem Thermostat ('Thermochem', Fa. Lebisch) inkubiert. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von F-6-P, beendet durch Zugabe von 100 µl 0,5 N NaOH + 50 µl dest. H_2O und Erhitzen für 10 Minuten in einem siedenden Wasserbad.
Die Zugabe von NaOH bis auf eine Endkonzentration von 0,2 N war notwendig, um das im Testansatz noch vorhandene, nicht umgesetze F-6-P durch alkalische Hydrolyse zu zerstören. Saccharose bleibt durch diese Behandlung unbeeinflußt.

Nach anschließender Zentrifugation zur Abtrennung des denaturierten Proteins folgte der optische Test auf das gebildete Saccharose-P.

b) Optischer Test auf Saccharose-P

Er wurde nach der Methode von ROE (1934) in Anlehnung an die Beschreibung von CARDINI et al. (1955) folgendermaßen durchgeführt:

- Verdünnung von 200 µl Probelösung mit dest. H_2O 1:1
- Zugabe von: 400 µl 0,1 %-iger alkoholischer Resorcin-Lösung
  1200 µl 30 %-iger HCl
- Sofortiges Durchmischen des Reaktionsgemisches (2 ml) und anschließende Inkubation bei 80°C für 10 Minuten im Thermostat.
- Nach Abkühlen der Proben wurde die Absorption des gebildeten kirschroten Farbstoffs bei 490 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Saccharose-P-Konzentrationen diente eine Eichkurve mit Saccharose als Standard (Abb. 2).
Durch Aufbewahren der Proben bei 4°C blieb die Färbung der Proben über mindestens 2 Tage unverändert erhalten.

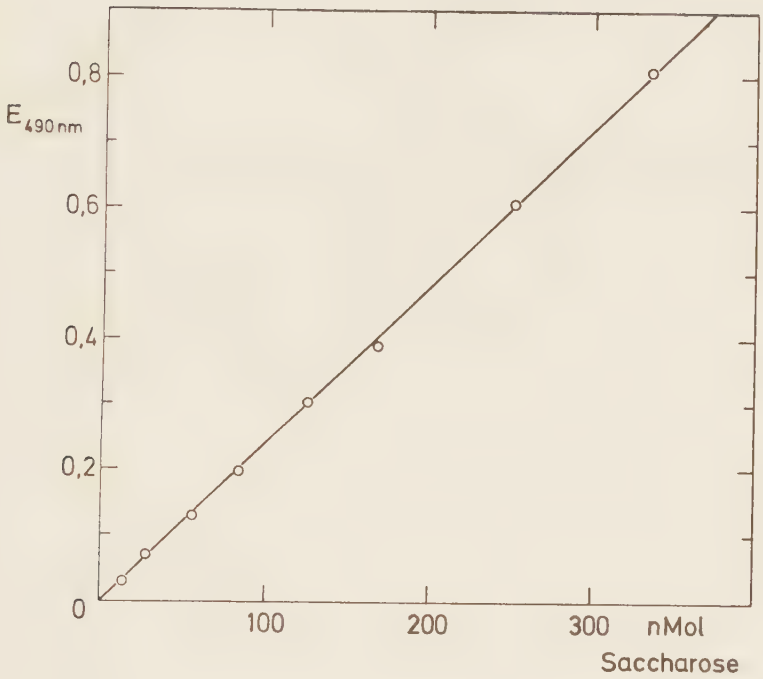
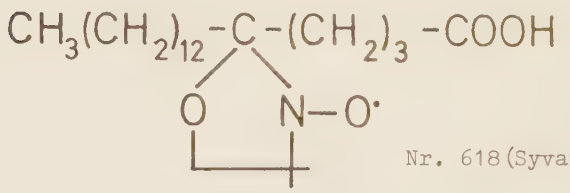


Abb. 2: Eichkurve zur Bestimmung der Saccharose-P-Konzentration, mit Saccharose als Standard.

2.10. ESR-Messungen von Spin-markierten Zellen

2.10.1. Spin-Label

Zur Markierung der Membranen der Algenzellen wurde ein Stearinsäure - Spinlabel folgender Struktur eingesetzt:



Nr. 618 (Syvar, Palo Alto)

2-(3-Carboxypropyl)-4,4-dimethyl-2-tridecyl-3-oxazolidinyloxyl

2.10.2. Einbau des Spin-Label

200 ml Zellsuspension aus Kulturen mit 2, 6 und 12 % NaCl im Nährmedium wurden durch Zentrifugation geerntet und in einem Minimalvolumen von 1 - 2 ml des isotonischen, mit 20 mM Tricin-NaOH auf pH 7,7 gepufferten Nährmediums resuspendiert.
Diese hochkonzentrierte Zellsuspension wurde in einem 50 ml Erlenmeyer-Kolben überführt, dessen Boden mit einer dünnen Schicht des Spin-Labels überzogen war.
Dazu wurden pro Ansatz 100 µl einer frisch angesetzten äthanolischen Lösung des Spin-Labels (2 mg/100 µl) unter N_2-Strom am Boden des Erlenmeyer-Kolbens eingetrocknet.
Auf diese Weise wurden die Zellen 20 Stunden bei 25°C mit dem Spin-Label inkubiert.
Kurz vor Beginn der ESR-Messungen wurde die Zellsuspension mit gepuffertem Nährmedium verdünnt und durch zweimalige Zentrifugation bei 800 g (1 Minute), die intakten Zellen

von Zellfragmenten abgetrennt und gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in einem Minimalvolumen von 1 - 2 ml gepuffertem Nährmedium suspendiert und für die Messungen in eine Quarzküvette mit einem Innendurchmesser von etwa 1 mm überführt.

2.10.3. Aufnahme der ESR-Spektren [+]

Die ESR-Spektren wurden mit einem Varian E-12 ESR-Spektrometer oder einem Varian E-Line Century ESR-Spektrometer bei ansteigender Temperatur aufgenommen. Die Temperatur der Proben wurde dabei in Schritten von 2 - 6°C erhöht, vor jeder Messung wurden 3 Minuten zum Temperaturausgleich abgewartet. Nach Abschluß jeder ansteigenden Meßreihe wurde die Probe wieder auf die Ausgangstemperatur abgekühlt und bei dieser Temperatur ein Kontrollspektrum aufgenommen.

[+]Für die Aufnahme der ESR-Spektren danke ich herzlich Herrn Dr. Krauß und Herrn P. Schuler, Inst. für Chemie der Universität Tübingen.

2.11. Puffer, Lösungen und Reagenzien

Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5, bzw. 8,0
0,1 m Na_2HPO_4 mit 0,1 m NaH_2PO_4 auf pH 7,5, bzw. 8,0 eingestellt, und mit bidest. H_2O 1:1 verdünnt.

Tricin-Puffer, pH 7,5, bzw. 7,7
50 mM Tricin mit 1 N NaOH auf pH 7,5, bzw. 7,7 eingestellt.

Pyridin-Essigsäure-Puffer, pH 4,0
10 ml Pyridin in 965 ml dest. H_2O mit ca. 35 ml Eisessig auf pH 4,0 eingestellt.

Dioxan-Szintillator
10,5 g PPO
0,45 g POPOP
150,0 g Naphtalin
mit Dioxan auf 1500 ml auffüllen und nach Auflösen der Substanzen mit dest. H_2O auf 1800 ml auffüllen.

Alkalisches Cu-Reagenz
50 ml 2 % Na_2CO_3-Lösung
0,5 ml 2,7 % KNa-Tartrat-Lösung
0,5 ml 1 % $CuSO_4$-Lösung

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (MERCK)
mit dest. H_2O 1:1 verdünnt

Sämtliche wässrigen Lösungen, die bei Enzymreinigung und -charakterisierung eingesetzt wurden, waren mit bidest. H_2O angesetzt.

2.12. Chemikalien

Von Amersham - Buchler, Braunschweig
$NaH^{14}CO_3$ (540 µl, wässrige Lösg., 1 mCi, 58,5 mCi/mmol)

Von Bio-Rad, München
Bio-Gel A 1,5 m

Von Boehringer, Mannheim
Uridin-5'-diphospho-Glucose (Dinatriumsalz)
Glycerin-Enzymtest
Saccharose-Glucose-Enzymtest Nr. 15 824

Von Du Pont, Wilmington USA
Ludox, AM

Von Hormuth - Vetter, Heidelberg
Whatman DEAE-Cellulose (DE 52)

Von Macherey, Nagel & Co., Düren
Cellulose MN 300

Von Pharmacia, Upsala
Sephadex G-25
Sephadex G-200
Dextran Blau
Ficoll

Von Serva, Heidelberg
Albumin aus Rinderserum
Ammoniumsulfat
Acrylamind, BIS, TEMED, PER
Coomassie-Brillant Blue G-250
DDSA, DMP-30
Dowex 50 W x 8
Epon 812
Fructose-6-phosphat (F-6-P, Ba-Salz)
Invertase (aus Hefe)
MNA
Riboflavin

Von Syvar, Palo Alto
Stearinsäurenitroxid-Spinlabel (Nr.618)

Alle übrigen Chemikalien stammten von Merck, Darmstadt

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

3.1. Temperaturabhängigkeit des ^{14}C-Einbaumusters bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen im Nährmedium

Diese Experimente gingen von einer Beobachtung aus, die in Vorversuchen zum $^{14}CO_2$-Einbau in Dunaliella gemacht wurden.

Dabei trat nach Auftrennung und Autoradiographie von Extrakten im Fixierungsmuster eine Substanz mit einer ungewöhnlich hohen Einbaurate auf. Radioaktivitätsmessungen ergaben einen Anteil von bis zu 76 % am Gesamteinbau in den Extrakt.
Ursache dieser überraschenden Ergebnisse war eine unbeabsichtigte Veränderung der Versuchsbedingungen.
Nach dem Ausfall der bis dahin bei den Fixierungsexperimenten verwendeten Belichtungsquelle (Philips Attralux, 300 W) wurde eine neue Lampe (Philips Comptalux, 300 W) eingesetzt.
Diese bewirkte auf Grund ihrer höheren Wärmestrahlung eine Erhöhung der Temperatur der Suspension während der Fixierungsexperimente, und zwar von 25°C auf über 40°C.
Die Lage der Substanz auf dem Chromatogramm und frühere Untersuchungen von WEGMANN (1968) legten die Vermutung nahe, daß es sich dabei um Saccharose handeln mußte.
Diese Vermutung konnte durch die Identifizierungsexperimente bestätigt werden (siehe dazu Kap. 2.5.):

- Die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Hydrolysats ergab nach Autoradiographie zwei Substanzflecken. Die Co-Chromatographie des Hydrolysats mit D-Glucose und D-Fructose ergab eine Deckungsgleichheit der Schwärzungsflecke des Hydrolysats auf dem Autoradiogramm mit den durch Anisidinphosphat gefärbten Zuckern auf der Dünnschichtplatte.
- Die enzymatische Spaltung der Substanz durch ß-Fructosidase verlief positiv. Die Reaktionsprodukte konnten als D-Glucose und D-Fructose nachgewiesen werden.

Die Substanz wurde somit eindeutig als Saccharose identifiziert.

Die folgenden $^{14}CO_2$-Einbauversuche sollten nur einen genauen Aufschluß darüber geben, in welcher Weise die Temperatur die Saccharose-Biosynthese in Dunaliella beeinflußt.
Dazu wurden bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen im Nährmedium (2, 6, 12 %) im Temperaturbereich zwischen 10 und 45°C (in 5° Stufen) $^{14}CO_2$-Fixierungen durchgeführt.

Das Ergebnis zeigen die umseitige Tabelle 1 und die Abbildungen 3 und 4.

Anmerkung zu Tabelle 1: Gesamteinbau und absoluter Einbau in Saccharose sind angegeben in DPM/ mg Chlorophyll x 10 Minuten

Tabelle 1: Absoluter und relativer $^{14}CO_2$-Einbau in Saccharose in Abhängigkeit von der Temperatur, bei drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen im Nährmedium.

NaCl-Konz.	Temperatur	10	15	20	25	30	35	40	45
2 %	Gesamteinbau	49,4	46,1	31,0	23,9	24,5	36,3	34,1	--
	Einbau in Sac. abs.	0,25	--	--	0,31	2,45	9,1	9,6	--
	proz.	0,50	--	--	1,30	10,0	25,1	28,0	--
6 %	Gesamteinbau	28,1	21,3	16,8	15,9	20,2	24,2	23,7	(1,5)
	Einbau in Sac. abs.	0,06	0,03	0,03	0,08	0,20	5,0	5,8	(2,2)
	proz.	0,20	0,15	0,20	0,50	1,0	20,5	24,3	(14,9)
12 %	Gesamteinbau	38,6	39,3	31,3	26,7	19,4	22,9	32,0	32,9
	Einbau in Sac. abs.	0,08	--	--	0,11	0,04	0,40	8,80	15,4
	proz.	0,20	--	--	0,40	0,20	1,90	27,4	46,7

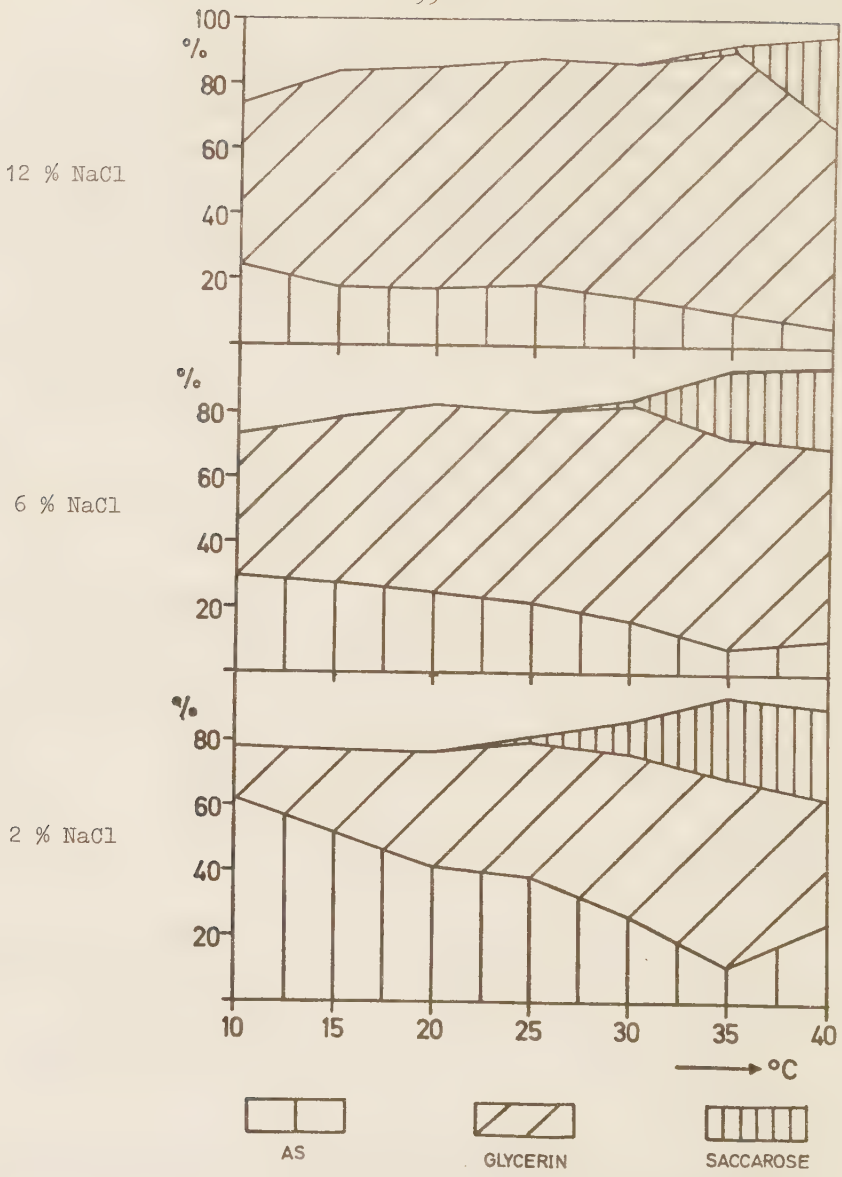


Abb. 3: Prozentuale ^{14}C-Verteilung auf die Fixierungsprodukte Saccharose, Glycerin und Aminosäuren (AS) in Abhängigkeit von der Temperatur bei 2, 6 und 12 % NaCl im Nährmedium.
Fixierung: 10 Minuten mit je 20 /uCi $NaH^{14}CO_3$
Vorbelichtung: 20 Minuten
Beleuchtungsintensität: 40 000 Lux

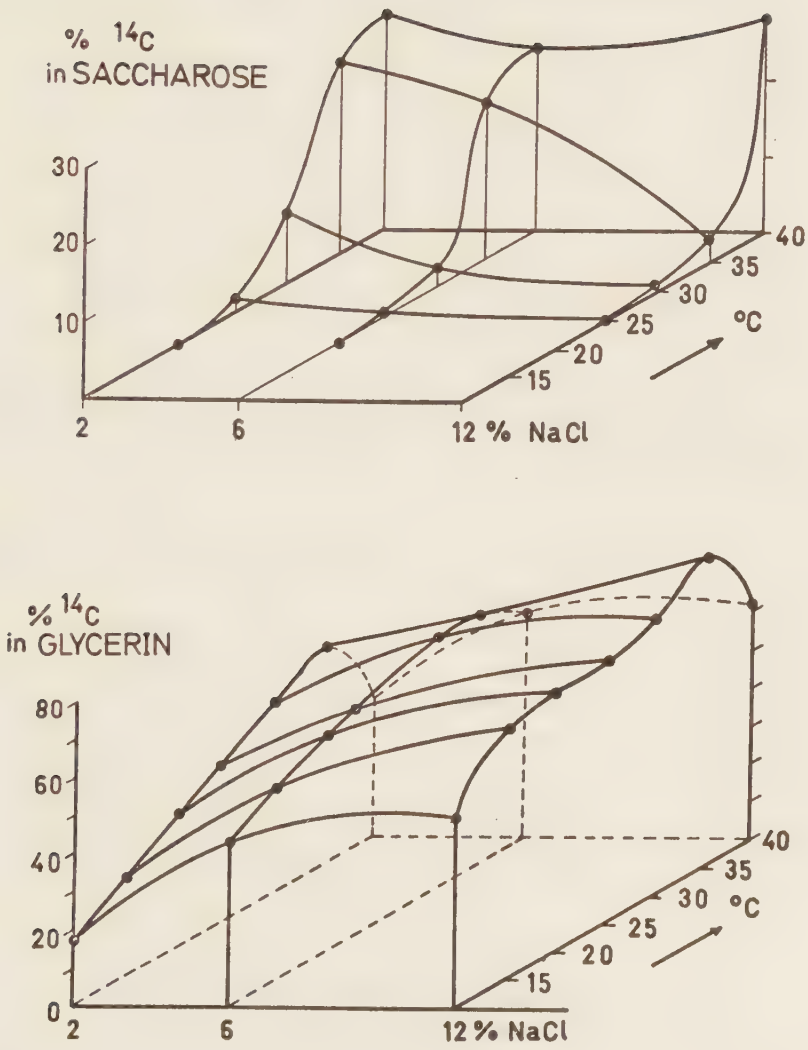


Abb. 4: Dreidimensionale Darstellung des ^{14}C-Einbaus in Saccharose und Glycerin in Abhängigkeit von der Temperatur und dem NaCl-Gehalt des Nährmediums. (Versuchsbedingungen siehe Abb. 3)

In Abbildung 3 wurde zum Vergleich neben dem prozentualen Einbau von ^{14}C in Saccharose auch der Einbau in die zwei Hauptverbindungen (bzw. Verbindungsgruppen) Glycerin und Aminosäuren aufgetragen. Der nicht bezeichnete Restanteil, der zwischen 5 und 27 % ausmacht, besteht überwiegend aus Zuckerphosphaten und Säuren des Citrat-Zyklus.

Werte bei 45°C wurden hier nicht aufgetragen, da bei dieser Temperatur nur bei 12 % NaCl im Nährmedium der Stoffwechsel der Zellen noch intakt war. Bei 6 % NaCl sank der Gesamt-^{14}C-Einbau auf 6 % des Wertes von 40°C und bei 2 % NaCl war kein ^{14}C-Einbau in die Zellen mehr festzustellen.

Die Abbildung 4 faßt den Verlauf des ^{14}C-Einbaus in Saccharose im Vergleich zu Glycerin in Abhängigkeit von Temperatur und NaCl-Gehalt des Nährmediums in einer dreidimensionalen Darstellung zusammen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Saccharose-Biosynthese in Dunaliella eine außergewöhnlich starke Temperaturabhängigkeit aufweist.
Erst ab einer für jede NaCl-Konzentration im Nährmedium typischen Temperatur setzt die Synthese in nennenswertem Ausmaß ein. Die ^{14}C-Einbauraten unterhalb dieser Temperatur liegen bei maximal 0,2 - 0,5 %. Oberhalb dieser Temperatur steigt die Einbaurate rapide an, es ergeben sich Q_{10}-Werte von über 20.

Ein solch charakteristischer Temperatureinfluß ist bei den anderen, nach 10 Minuten Photosynthese markierten Verbindungen, nicht festzustellen.

3.2. Kinetik der Saccharose- und Glycerinsynthese

Die ^{14}C-Einbauversuche ergaben erste wesentliche Anhaltspunkte zur Physiologie der Saccharose-Biosynthese. Die folgenden Versuche hatten das Ziel, die vorliegenden Ergebnisse durch genauere quantitative Messungen zu untermauern. Außerdem sollten

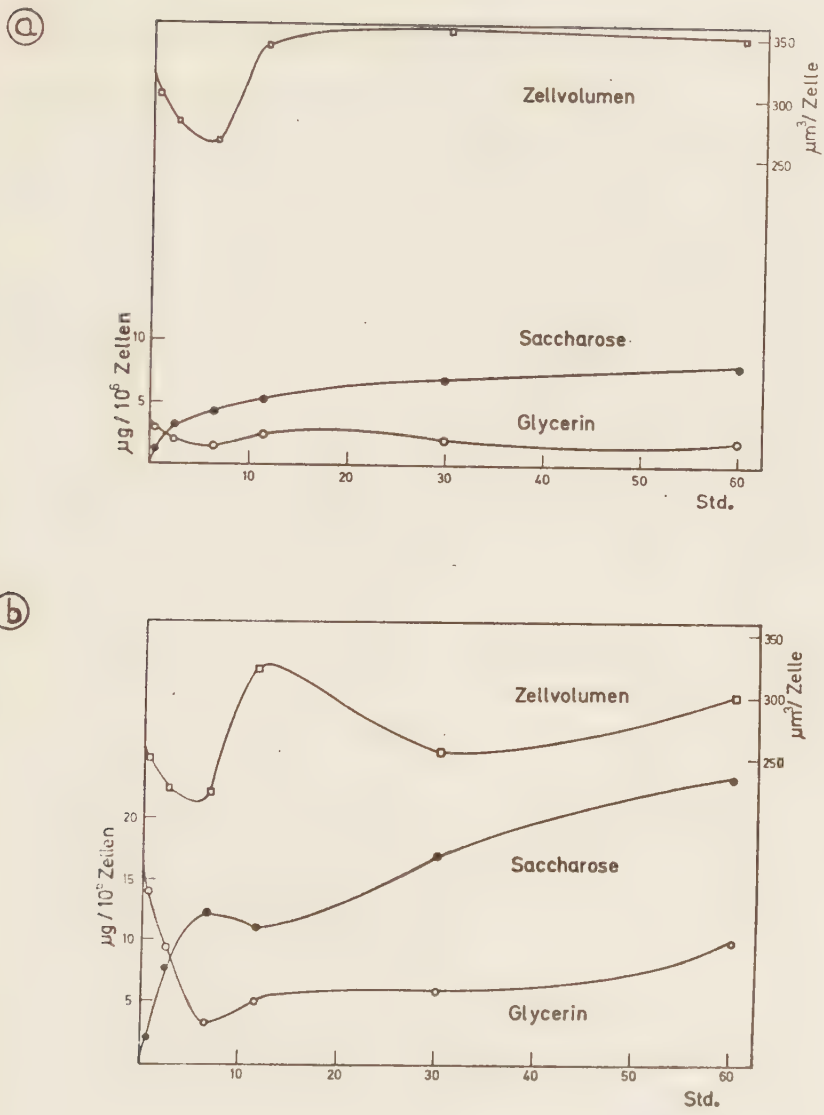


Abb. 5: Kinetik der Saccharose- und Glycerinsynthese und deren Einfluß auf das Zellvolumen
a) bei 2 % NaCl im Nährmedium und 35°C
b) bei 12 % NaCl im Nährmedium und 45°C

Anhaltspunkte gewonnen werden über die Bedeutung der Saccharose als Osmotikum für die Zellen.

Dazu wurden die Veränderungen im Saccharose- und Glyceringehalt der Zellen (nach Einstellung der Optimaltemperatur für die Saccharosesynthese) im zeitlichen Verlauf enzymatisch bestimmt. Gleichzeitig wurde das Zellvolumen (Naßvolumen) mit Haematokrit-Röhrchen gemessen.

Die für die Versuche verwendeten Kulturen wurden 4 Tage bei 25°C angezogen und zum Zeitpunkt Null auf 35° bzw. 45°C gebracht; den Optimaltemperaturen der Saccharosesynthese bei den beiden NaCl-Konzentrationen.

Das Ergebnis der Versuche zeigt die Abbildung 5.

Bei der 12 %-igen Kultur begannen die Zellen nach etwa 10 Stunden zu zerfallen, nach 30 Stunden war die Zellzahl auf die Hälfte gefallen, nach etwa 60 Stunden war die Kultur fahlgrün.

Bei der 2 %-igen Kultur war ebenfalls die Zellteilung gehemmt, doch blieb die Zellzahl über den gesamten Versuch konstant.

Das Ergebnis bestätigt die durch die ^{14}C-Einbauversuche erhaltenen Werte.
Nach 6 Stunden ist der Saccharosegehalt der Zellen sowohl bei 2 % wie bei 12 % NaCl auf das ca. 20-fache des Wertes bei 25°C gestiegen. Gleichzeitig damit fällt der Glyceringehalt der Zellen. Während des Versuches beginnt er zwar wieder zu steigen, bleibt aber dennoch wesentlich unter dem der Saccharose.

Zwischen dem Glyceringehalt der Zellen und dem Zellvolumen ist eine Abhängigkeit zu erkennen, zumindest fällt nach der Temperaturerhöhung das Zellvolumen bei beiden Versuchen parallel zum Glyceringehalt.
Ein wesentlicher Einfluß des Saccharosegehaltes der Zellen auf das Zellvolumen ist aus diesen Versuchen nicht ersichtlich.

3.3. Osmotische Regulation der Saccharose-Synthese

Dieser Versuch untermauert noch einmal die schon in Abbildung 3 und 4 erkennbare wechselseitige Abhängigkeit der Saccharosesynthese von der Temperatur und der NaCl-Konzentration des Nährmediums. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 6.

Die verwendeten Zellkulturen wurden bei 25°C angezogen.

Die für diesen Versuch gewählte Temperatur von 35°C bedeutet bei einer 2 %-igen NaCl-Konzentration Optimalbedingung, bei Erhöhung der NaCl-Konzentration fällt der Saccharosegehalt und erreicht bei 12 % (der höchsten eingesetzten NaCl-Konzentration) ein Minimum, da hier die kritische Temperatur gerade erst erreicht ist. Im Gegensatz dazu steigt bei 35°C (wie auch bei jeder anderen Temperatur zwischen 10 und 40°C, s. Abb. 3 + 4) der Glyceringehalt der Zellen mit steigendem osmotischem Wert des Nährmediums in einer Geraden an.

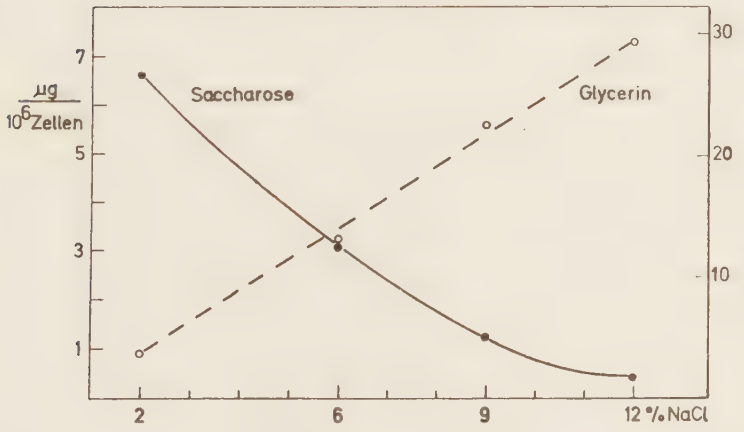


Abb. 6: Saccharose- und Glyceringehalt der Zellen nach 24 Stunden Photosynthese bei 35°C.

3.4. Kinetik der Saccharose-Synthese im Licht und Dunkeln

Zur Gesamtbeurteilung der Physiologie der Saccharose-Synthese war es notwendig zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß auch im Dunkeln Saccharose gebildet wird oder ob eine direkte Abhängigkeit der Synthese von der photosynthetischen CO_2-Fixierung besteht, wie dies bei der Glycerin-Synthese der Fall ist.

Dazu wurde bei einer Temperatur von 40°C von zwei Kulturen mit unterschiedlicher osmotischer Belastung (6 und 12 % NaCl im Nährmedium) eine Kinetik bei Belichtung und Dunkelheit aufgenommen. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 7.

Beide Kulturen wurden bei 25°C im Licht angezogen (8000 Lux) und zum Zeitpunkt Null auf 40°C im Licht, bzw. Dunkelheit umgesetzt. Die absoluten Saccharose-Konzentrationen wurden wiederum enzymatisch bestimmt. (Ebenso die Glycerinkonzentrationen der Zellen und des Nährmediums; s. dazu Kap. 3.6.). Nach 10 Stunden wurde die Lichtkultur verdunkelt und die Dunkelkultur belichtet.

Die Zellen der Dunkelkultur hatten nach diesen 10 Stunden nur noch etwa ein Drittel des Volumens der Zellen der Lichtkultur (bei 40°C) und begannen zu zerfallen, so daß von diesen Kulturen nur noch je eine Probe gemessen wurde.
Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß auch im Dunkeln die schon bei Belichtung der Zellen beobachtete Charakteristik der Saccharose-Synthese auftritt. Jedoch ist im Dunkeln der Gehalt der Zellen an Saccharose niedriger.
Berücksichtigt man jedoch die durch die Dunkelzeit bewirkte Volumenabnahme der Zellen und bezieht die gemessenen Saccharose-Werte statt auf die Zellzahl auf das Zellvolumen, so ergibt sich nach 10 Stunden bei 6 % NaCl im Dunkeln in etwa dieselbe Saccharose-Konzentration wie im Licht. Bei 12 % NaCl erreicht sie im Dunkeln sogar etwa die 1,5-fache Konzentration wie im Licht. Eine Verdunklung der Lichtkulturen bei 40°C bewirkt bei beiden NaCl-Konzentrationen einen geringfügigen Anstieg der Saccharose-Konzentration der Zellen.

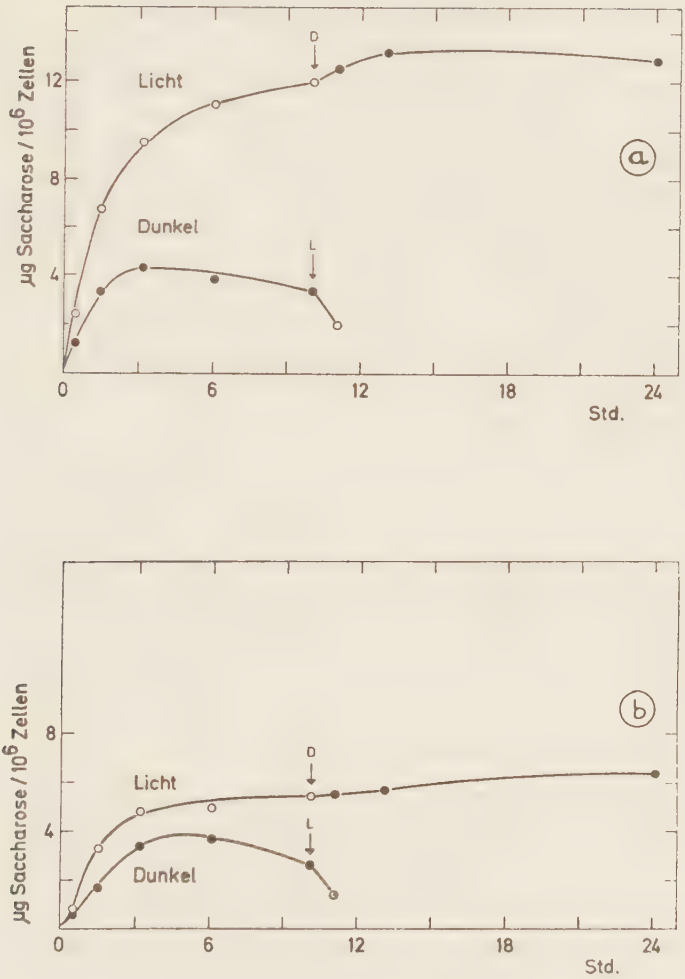


Abb. 7: Kinetik der Saccharose-Synthese im Licht und Dunkeln
a) bei 6 % NaCl und 40°C
b) bei 12 % NaCl und 40°C

3.5. Einfluß der Dunkelzeit auf die Saccharose-Synthese

Die vorangegangenen Versuche zur Saccharose-Synthese im Dunkeln erbrachten als wesentliches Ergebnis, daß die Zellen oberhalb der kritischen Temperatur auch im Dunkeln Saccharose in beträchtlichem Maße synthetisieren, jedoch mit verminderter Syntheserate. Die Bildung von Saccharose ist also nicht, wie etwa die Glycerin-Synthese, an das Ablaufen der Photosynthese streng gebunden. Zumindest für die im Dunkeln synthetisierte Saccharose müssen also die Substrate aus dem Metabolismus von Reservekohlehydraten, in erster Linie wohl Stärke, stammen. Da die Stärkesynthese lichtabhängig ist, sollte also eine längere Dunkelzeit zu einer Verarmung an Substrat für die Saccharose-Synthese führen, die damit allmählich zum Erliegen kommen müßte.

In dem folgenden Versuch sollten diese Überlegungen geprüft werden.

Dazu wurde eine Zellkultur (6 % NaCl) bei 25°C im Dunkeln gehalten. Aus ihr wurden nach unterschiedlichen Dunkelzeiten Proben entnommen und diese ebenfalls im Dunkeln für 2 Stunden auf 40°C gebracht, wodurch die Saccharose-Synthese 'eingeschaltet' wurde. Zur Kontrolle wurde aus einer Lichtkultur bei 25°C zu denselben Zeiten Proben entnommen und im Licht ebenfalls für 2 Stunden auf 40°C gebracht.

Die Abbildung 8 zeigt das Versuchsergebnis, das die obigen Überlegungen bestätigt. Nach ca. 12 Stunden Dunkelzeit erfolgt eine rapide Abnahme der Saccharose-Synthese, die nach 70 Stunden fast auf Null gesunken ist.

Die Saccharose-Synthese bei 40°C im Licht wird dagegen (innerhalb der 2 Stunden) durch die vorangegangene Dauer der Anzucht im Licht bei 25°C nicht beeinflußt. Die Schwankungen der Meßwerte liegen im Bereich der Fehlergrenze des Versuchs.

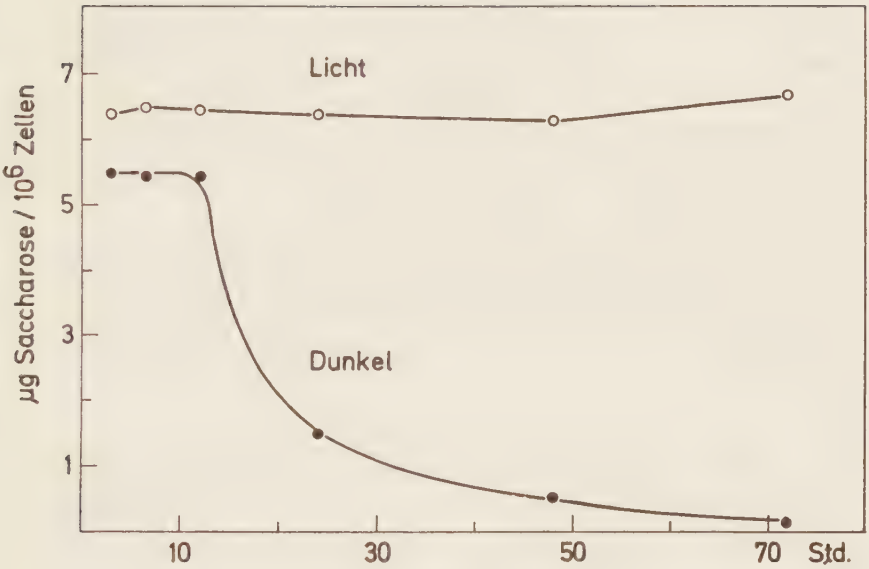


Abb. 8: Abhängigkeit der Saccharose-Synthese im Licht und Dunkeln bei 40°C von der vorangegangenen Licht- und Dunkelzeit bei 25°C.
Saccharosegehalt der Zellen nach 2 Stunden bei 40°C im Dunkeln nach unterschiedlich langer Vorverdunklung bei 25°C.
Saccharosegehalt der Zellen nach 2 Stunden bei 40°C im Licht nach unterschiedlich langer Anzucht im Licht bei 25°C.

3.6. Glycerin-Ausscheidung der Zellen

Die Untersuchung der Kinetik der Saccharose- und Glycerinsynthese bei 35°C (2 % NaCl) und 45°C (12 % NaCl) (siehe Abbildung 5), wie auch die ^{14}C-Einbauversuche legten die Vermutung nahe, daß auf Grund des gleichzeitigen Absinkens des Glyceringehaltes der Zellen bei einsetzender Saccharose-Synthese, der Kohlenstoff-Fluß unter Photosynthesebedingungen auf Kosten des Hauptprodukts Glycerin zur Saccharose hin umgesteuert wird.

Um diese Vermutung zu klären, wurde bei den Versuchen zur Kinetik der Saccharose-Synthese im Licht und Dunkeln (Kap. 3.4., Abbildung 7) von den Proben der Lichtkultur und zusätzlich von der Nährlösung der Glyceringehalt enzymatisch bestimmt.

Das Ergebnis zeigt die Abbildung 9.

Es wird deutlich, daß die Temperaturerhöhung der Suspension von 25 auf 40°C spätestens nach 30 Minuten eine verstärkte Ausscheidung von Glycerin in die Nährlösung bewirkt.
Nach etwas 2 Stunden befindet sich in der Nährlösung schon etwa die doppelte Glycerinmenge wie bei 25°C.

Der Glyceringehalt der Zellen fällt durch die Temperaturerhöhung auf etwa 80 % des Wertes von 25°C.

Addiert man die gemessenen Werte für Zellen und Nährlösung, so ergibt sich bei 6 % NaCl bei 40°C eine schwach erhöhte Syntheserate gegenüber 25°C.
Bei 12 % NaCl steigt bei 40°C die Syntheserate auf das Doppelte.

Somit ist der Abfall des Glyceringehaltes der Zellen bei der Temperaturerhöhung auf eine dadurch bewirkte stark ansteigende Glycerinausscheidung der Zellen zurückzuführen.
Die Temperaturerhöhung bewirkt bei beiden NaCl-Konzentrationen zugleich eine verstärkte Glycerinsynthese.

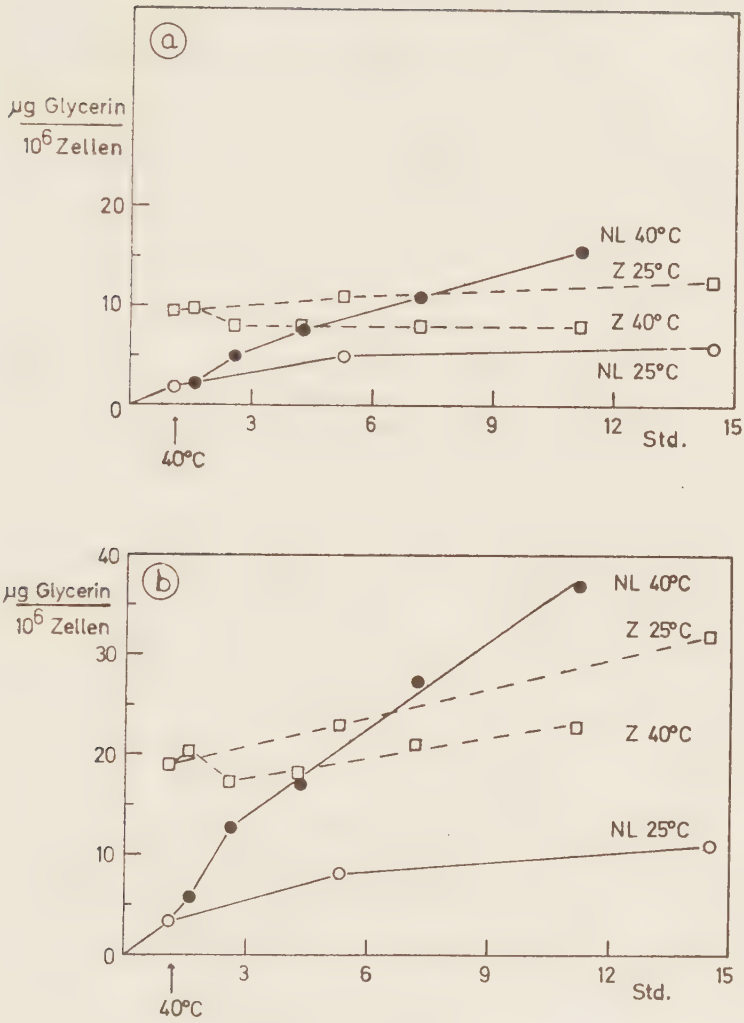


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf des Glyceringehaltes der Zellen (Z) und der Glycerinausscheidung in die Nährlösung (NL) während der Photosynthese bei 25 und 40°C.
a) Bei 6 % NaCl b) bei 12 % NaCl

3.7. Bestimmung der Na^+-Konzentration der Zellen

Die hierzu durchgeführten Versuche sollten Anhaltspunkte liefern, in welchem Maße die Natrium-Ionen, die den Hauptanteil der Kationen im Nährmedium ausmachen, bei der Aufrechterhaltung des Zellturgors im Vergleich zu Saccharose und Glycerin beteiligt sind.
Voraussetzung für eine exakte Bestimmung des Na^+-Gehaltes der Zellen war eine möglichst vollständige Abtrennung des stark NaCl-haltigen Nährmediums.
Die zuerst angewandte Methode (Waschen der Zellen mit isotonischer Glycerin-Lösung) erbrachte bei der Bestimmung der Na^+-Konzentration der Zellen keine reproduzierbaren Ergebnisse. Außerdem ließen die äußerst niedrigen Werte (Na^+-Konzentrationen in den Zellen unter 10 mM) zusätzliche Zweifel an dieser Methode aufkommen.
Eine Überprüfung der Methode durch die Aufnahme einer Kinetik der Na^+-Konzentration im Waschmedium ergab, daß nach 2 Minuten über 95 % der in den Zellen befindlichen Na^+-Ionen in das Waschmedium diffundiert sein mußten.
Die auf die Zellen umgerechnete Na^+-Konzentration des Waschmediums ergab bei Abzug der maximal möglichen Verunreinigung des Waschmediums (durch bei der Zentrifugation im Sediment zurückbleibendes Nährmedium) eine Konzentration von etwa 300 mM.
Die daraufhin zur Abtrennung des Nährmediums angewandte Zentrifugation der Zellen in ein Petrolbenzin-Tetrachlorkohlenstoff-Gemisch erbrachte relativ gut reproduzierbare Ergebnisse. Die Ergebnisse unterschiedlicher Versuche hatten eine Streuung von etwa $\pm$ 15 %.
Es wurden für diese Versuche synchronisierte Zellen eingesetzt. Die gemessenen Na^+-Konzentrationen wurden auf das gleichzeitig gemessene Zellvolumen bezogen. In Abbildung 10 ist das Versuchsergebnis dargestellt. Für die darin aufgezeichnete Na^+-Konzentration der Zellen wurde ein den Na-Ionen zugänglicher Lösungsraum von 50 % des Zellvolumens zugrunde gelegt.

Unter dieser Annahme beträgt die Na^+-Konzentration in den für die Natrium-Ionen zugänglichen Zellkompartimenten zwischen 64 und 83 % der des Nährmediums.

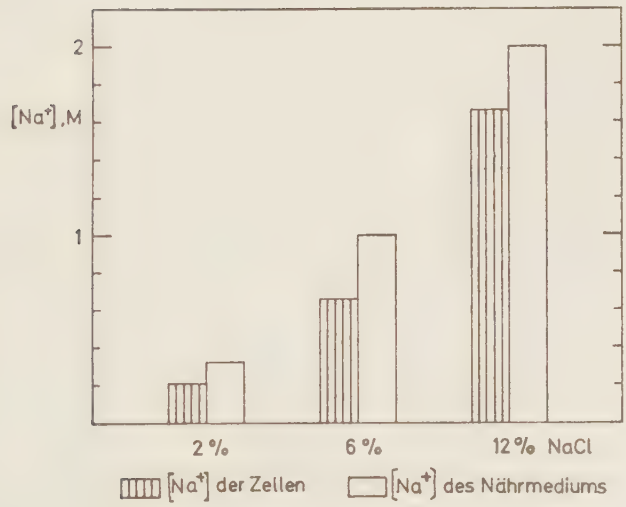


Abb. 10: Na^+-Konzentration der Zellen im Vergleich zu der des Nährmediums.

3.8. Versuche zur Chloroplasten-Isolierung aus Dunaliella

Die Erarbeitung einer geeigneten Technik zur Isolation von Chloroplasten aus Dunaliella sollte die Voraussetzungen schaffen für anschließende ^{14}C-Einbauversuche mit isolierten Dunaliella-Chloroplasten. Mit diesen geplanten ^{14}C-Einbauversuchen sollten Erkenntnisse gewonnen werden, sowohl hinsichtlich dem Ort der Saccharose-Biosynthese, wie auch über den temperaturabhängigen Transport von Metaboliten des Chloroplasten-Stoffwechsels durch die Chloroplasten-Hüllmembran.
Durch osmotischen Schock der Zellen und anschließende Differentialzentrifugation (siehe Kap. 2.8.) gelang es zwar eine 'Chloroplasten-Fraktion' zu gewinnen, die einen Anteil morphologisch intakter Chloroplasten enthielt (siehe Abb. 12). Diese Fraktion war jedoch nicht einheitlich, sie enthielt neben aufgebrochenen Chloroplasten noch Mitochondrien und konnte vor allem durch eine anschließende Ludox-Dichtegradienten-Zentrifugation nicht wesentlich von diesen Bestandteilen gereinigt werden. (Dichtegradienten mit Saccharose brachten noch schlechtere Ergebnisse).

Auch andere Aufschlußmethoden (Homogenisation der Zellen mit Sorvall Omni Mixer, Sorvall Rible Press oder Bühler Homogenisator) erbrachten nach der Dichtegradienten-Zentrifugation keine verbesserten Ergebnisse, so daß diese Versuche abgebrochen wurden.
Ein elektronenmikroskopischer Vergleich zwischen Dunaliella-Zellen und Dunaliella-Chloroplasten zeigen die Abbildungen 11 und 12 (zur Methodik siehe Kap. 2.8.3.).

Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Dunaliella-Zelle
(Gerät: Siemens 1, 60 kV, EM-Vergrößerung: 7 500
End-Vergrößerung: ca. 15 000)

Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dunaliella-Chloroplasten
(Gerät: Siemens 102, 60 kV, EM-Vergrößerung: 8 000
End-Vergrößerung: ca. 16 000)

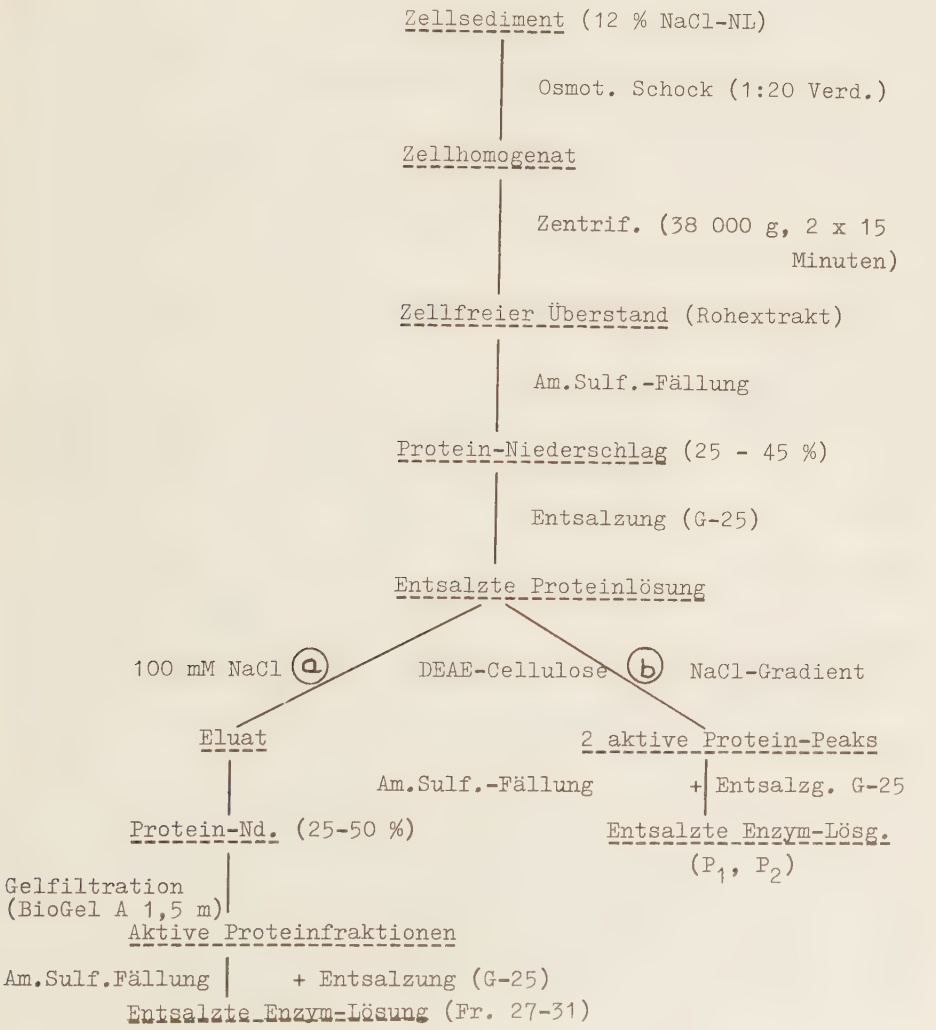
Abb. 11

Abb. 12

3.9. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Saccharose-P-Synthetase (EC 2.4.1.14)

3.9.1. Isolierung und Reinigung

Eine Zusammenfassung des erarbeiteten Isolierungs- und Reinigungsverfahrens zeigt das folgende Schema:



Die vorangegangenen physiologischen Untersuchungen hatten eine ungewöhnliche thermische und osmotische Regulation der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella aufgezeigt.
In den folgenden Experimenten sollte nun der Einfluß der physiologischen Faktoren, einschließlich der Substratkonzentrationen, auf Enzymebene untersucht werden.
Dazu wurde das Schlüsselenzym der Saccharose-Biosynthese, die Saccharose-P-Synthetase aus Dunaliella isoliert und gereinigt, und seine Eigenschaften untersucht.
Eine Aktivität der Saccharose-Synthetase (EC 2.4.1.13) konnte in Vorversuchen im Rohextrakt nicht nachgewiesen werden. (Reinigungsschema siehe oben).

Der nach dem ersten Reinigungsschritt, der Ammoniumsulfat-Fällung gewährte Weg a), mit einer abschließenden Gelfiltration an BioGel A 1,5 m, ergab eine insgesamt etwa 10fache Reinigung des Enzyms.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte zusammengefaßt:

Reinigungsschritt	Gesamt-Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg Prot.)	Reinigung (fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	240	15,0	0,062	1	100
Ammonium-sulfat (25-45%)	90	13,9	0,15	2,5	93
DEAE-Cellulose	54	10,4	0,19	3,1	69
Bio-Gel A 1,5 m					
Fr. 27-31	6,6	3,9	0,56	9,5	26
(Fr. 28	0,36	0,32	0,89	14,3	2,1)

Tabelle 2: Reinigung der Saccharose-P-Synthetase aus Dunaliella

Die folgende Abbildung 13 zeigt das Elutionsprofil der Saccharose-P-Synthetase von BioGel A 1,5 m. Das Enzym wird in der ersten Hälfte des Hauptprotein-Peaks eluiert. Bezieht man die Enzymaktivität auf die Proteinkonzentration (U/mg Protein), so ergibt sich für die erste Fraktion des Aktivitätspeaks (Fr. 28, entsprechend 112 ml Elutionsvolumen) die höchste spezifische Aktivität von 0,89 /uMol/Minute x mg Protein.

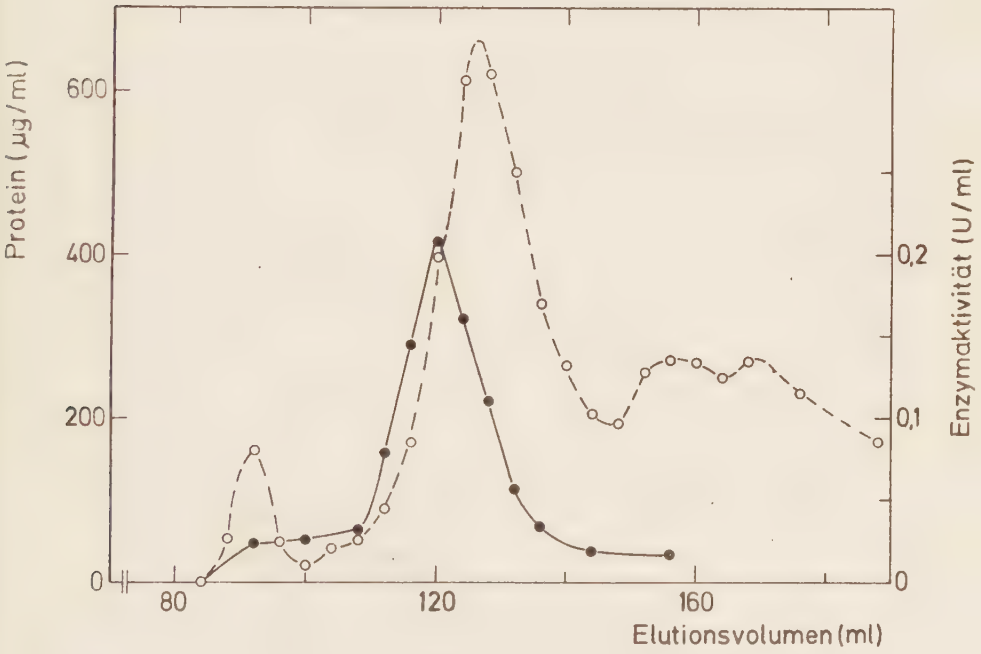


Abb. 13: Elutionsdiagramm der Saccharose-P-Synthetase von BioGel A 1,5 m

○- - - -○ Protein ●——● Enzymaktivität

Säule: 2,6 x 55 cm, Bed-Volumen: 290 ml

Puffer: 50 mM Na-Phosphat pH 7,5, 0,5 mM EDTA

Durchfluß: 12 ml/h, 4 ml Fraktionen gesammelt

Probevolumen: 2 ml (ca. 15 mg/ml)

Der bei den anfänglichen Versuchen nach der Ammoniumsulfat-Fällung gewählte Weg b) ergab durch die an der DEAE-Cellulose-Säule durchgeführten NaCl-Gradienten-Elution 2 Hauptprotein-Peaks, die beide die gesamte Enzymaktivität enthielten. Die Abbildung 14 zeigt das Elutionsprofil von dieser Säule. Die erste aktive Proteinfraktion (P_1) wurde bei einer Konzentration von 50 - 70 mM NaCl, die zweite (P_2) bei einer Konzentration von 80 - 100 mM NaCl eluiert.

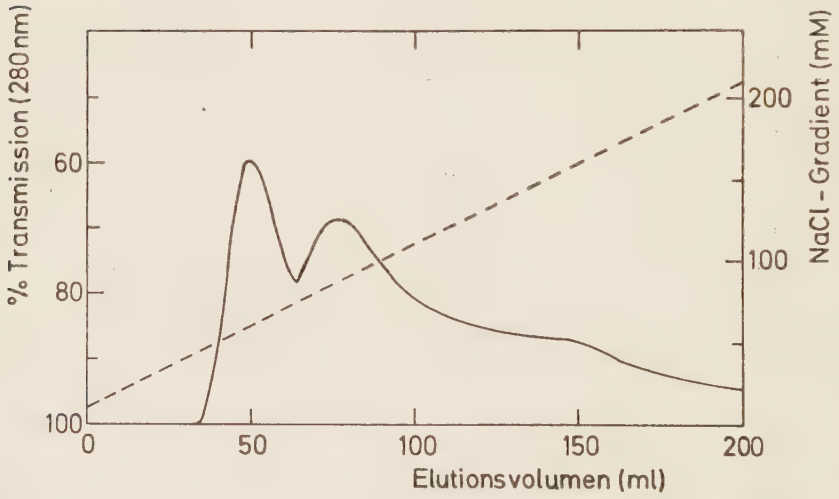


Abb. 14: Elutionsdiagramm der Saccharose-P-Synthetase von DEAE-Cellulose (Whatman, DE 52).
Säule: 2 x 10 cm, Bed-Volumen: ca. 30 ml
Puffer: 50 mM Na-Phosphat pH 8,0, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA
NaCl-Gradient: 10 - 210 mM, (200 ml Gesamtvolumen)
Durchfluß: 40 ml/h, 6 - 10 ml Fraktionen gesammelt
Probevolumen: 15 - 20 ml (ca. 2 mg/ml)

Die Ergebnisse dieser Reinigung an DEAE-Cellulose waren jedoch hinsichtlich der gemessenen Enzymaktivitäten außerordentlich schlecht reproduzierbar.
Die mit Ammoniumsulfat gefällten Fraktionen von Peak 1 hatten eine durchweg höhere (bis zu 3,8-fache) spezifische Aktivität als die Fraktionen von Peak 2. In Peak 1 wurde eine maximal 2-fache Reinigung gegenüber der 25 - 45 % Ammoniumsulfat-Fraktion erreicht.
Die höchste spezifische Aktivität in Peak 1 betrug 0,60 U.

Die Ergebnisse der bei diesem Versuch erzielten Reinigung sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Reinigungsschritt	Gesamt-Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg Prot.)	Reinigung (fach)	Ausbeute (%)
Ammoniumsulfat (30 - 55 %)	47	23,5	0,51	(1)	(100)
DEAE-Cellulose					
Peak 1	1,2	0,72	0,60	1,2	3,1
Peak 2	2,9	0,47	0,16	0,32	2,0

Tabelle 2 b: Reinigung der Saccharose-P-Synthetase an DEAE-Cellulose

Die Ammonium-Sulfat-Fraktion besitzt also hier, im Vergleich zu der bei Reinigung a) schon eine 4-fach höhere spezifische Aktivität. An der DEAE-Cellulose konnte dann aber nur noch eine etwa 20 %-ige Reinigung erzielt werden.
Die erreichte höchste spezifische Aktivität liegt dennoch um ein geringes höher als bei Reinigung a) (Fr. 27 - 31).

Das Enzym war in dem bei der abschließenden Gelfiltration (Entsalzung) benutzten Tricin-Puffer (die bei beiden Proben mit Sephadex G-200 einen einheitlichen Protein-Peak ergab) äußerst instabil. So war bei mehreren Versuchen nach der Gelfiltration ein völliger Aktivitätsverlust festzustellen.
Die Abbildung 15 zeigt eine Zusammenfassung der Elektrophorogramme der nach beiden Reinigungsverfahren erhaltenen Enzymfraktionen. Peak 1 und 2 ergeben je eine Bande. Fraktion 27- 31 je nach Wahl des Puffers bei der abschließenden Entsalzung (G-25) 2 bis 3 Banden.
Mit dem bei der Untersuchung von Peak 1 und 2 mit aufgetragenen Rinderserumalbumin konnte gleichzeitig zur Reinheitskontrolle eine grobe Molekulargewichtsbestimmung dieser beiden Fraktionen durchgeführt werden. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 16.
Für Peak 1 ergibt sich ein ungefähres Molekulargewicht von 470 000 und für Peak 2 von 380 000.

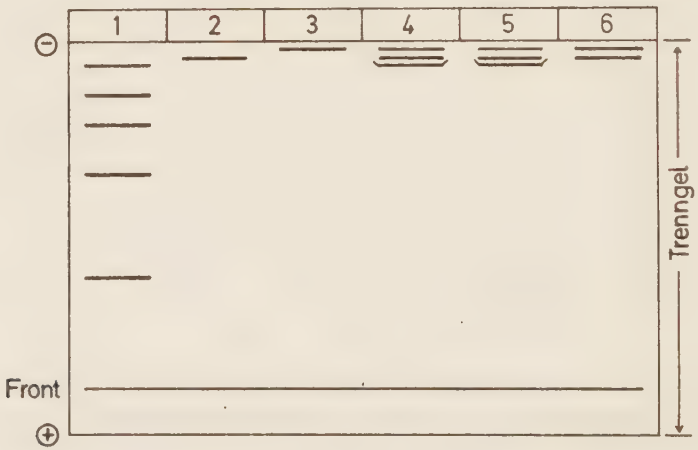


Abb. 15: Flachgelelektrophorese der gereinigten Enzymfraktionen
Trenngel: 8 % Polyacrylamid, pH 8,9
1 : Rinderserumalbumin 4 : Fraktion 27-31 (nicht entsalzt)
2 : Peak 2 5 : " 27-31 (entsalzt in PO_4^{3-}
3 : Peak 1 6 : " 27-31 (entsalzt in Tricin)

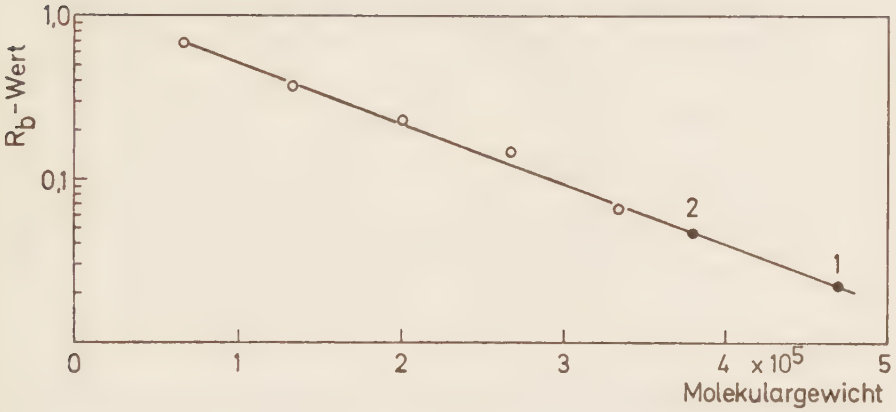


Abb. 16: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung mit Rinderserumalbumin als Eichprotein (R_b- Werte vom Versuch zu Abb. 15)
1 : Peak 1 2 : Peak 2

3.9.2. Einfluß der Enzymkonzentration und von Cofaktoren auf die Enzymaktivität

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist der Enzymkonzentration im Bereich zwischen 7 - 100 /ug direkt proportional. (Andere Konzentrationen wurden nicht getestet).
Mit Peak 1 wurden die ersten Experimente zum Einfluß von Mg- und Mn-Ionen auf die Enzymaktivität durchgeführt. (Die Enzymkonzentration im Testansatz betrug 30 /ug). Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle 3:

Zusatz	Konzentration	Aktivität (in % der Kontrolle)
$MgCl_2$	15 mM	149
$MgCl_2$	30 mM	130
$MnCl_2$	30 mM	145

Tabelle 3: Einfluß von Cofaktoren auf die Enzymaktivität

Weitere Untersuchungen ergaben auch für das nach Verfahren a) gereinigte Enzym (Fr. 27 - 31) eine starke Instabilität in Tricin-Puffer.
Nach 1 Tag (bei 4°C) sank die Aktivität auf 44 %, nach 4 Tagen war noch eine Restaktivität von 9 % vorhanden. Durch Zusatz von Phosphat (8,3 mM) und auch Citrat (25 - 50 mM) konnte eine gewisse Reaktivierung erreicht werden. Die Steigerung war maximal 10 % der Kontrollaktivität.

Bei der verbesserten Reinigung (Verfahren a)) wurde aufgrund dieser Ergebnisse nach dem Reinigungsschritt mit DEAE-Cellulose der Puffer nicht gewechselt und die Gelfiltration mit BioGel A 1,5 m in dem schon vorher benutzten Phosphat-Puffer durchgeführt.

Die dabei erhaltenen aktiven und durch Ammoniumsulfat-Fällung konzentrierten Fraktionen zeigten auch nach 1 Woche (bei 4°C) noch keinen Aktivitätsverlust.

3.9.3. Einfluß der Substratkonzentrationen

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration zeigt bei der getesteten Peak 1-Fraktion für beide Substrate hyperbolische Sättigungskurven (Abb. 17 + 18).

Sie folgt der Michaelis-Menten-Kinetik, wie aus der Lineweaver-Burk-Auftragung ersichtlich ist (Abb. 21 + 22), sowohl für F-6-P wie für UDPG ergibt sich eine Gerade. Bei F-6-P ist außerdem eine Substratüberschuß-Hemmung zu beobachten.

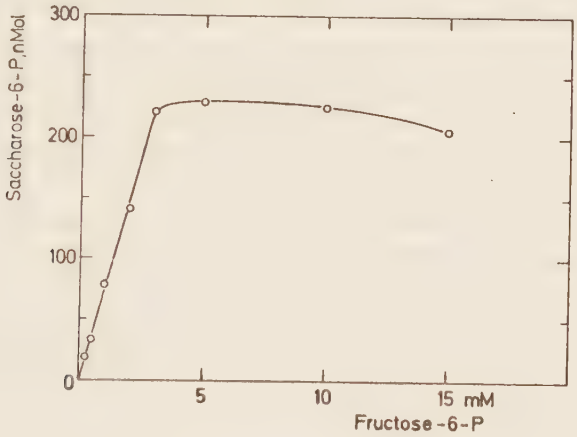


Abb. 17

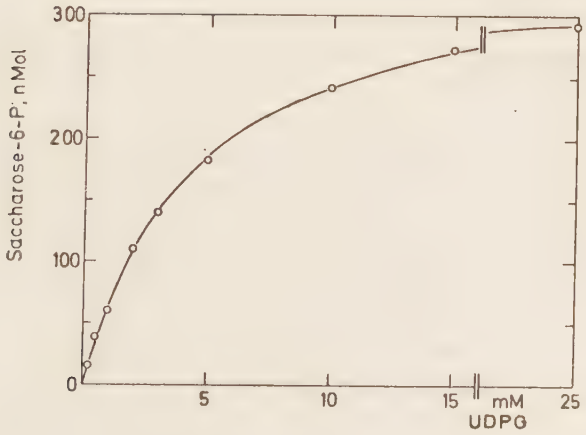


Abb. 18

Dieselbe Abhängigkeit wurde auch für die bei der verbesserten Reinigung (a) erhaltene Enzymfraktion (Fr. 27-31) untersucht. Die Kinetik für F-6-P wurde bei zwei verschiedenen Phosphat-Konzentrationen (8,3 und 25 mM) und in reinem Tricin-Puffer aufgenommen. Die höhere Phosphat-Konzentration ergab sich durch die Verdünngung von 50 µl Enzymlösung in 50 mM Phosphat-Puffer auf 100 µl im Testansatz. Die niedrigere Phosphat-Konzentration wurde durch eine in 50/3 mM Phosphat-Puffer durchgeführte abschließende Entsalzung der gefällten Enzymfraktionen und die im Testansatz resultierende Verdünnung erreicht.
Für F-6-P ergibt sich bei einer Phosphat-Konzentration von 25 mM eine im Gegensatz zu obigem Experiment sigmoide Sättigungskurve, siehe Abbildung 19.
Die Lineweaver-Burk-Auftragung ergibt eine aufwärts gebogene Kurve, was auf eine positive Kooperativität schließen läßt (Abbildung 21). Bei der niedrigen Phosphat-Konzentration (8,3 mM) zeigt die Substratsättigungskurve wieder einen hyperbolischen Verlauf, mit einer Substratüberschuß-Hemmung. Die Lineweaver-Burk-Auftragung ergibt eine Gerade (Abbildung 21).

Ebenfalls Michaelis-Menten-Kinetik zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der F-6-P-Konzentration in reinem Tricin-Puffer (sie wurde nicht aufgetragen). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit liegt hier um 66 % niedriger als mit 25 mM Phosphat.
Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der UDPG-Konzentration zeigt auch bei einer Phosphat-Konzentration von 25 mM (wie bei obigem Experiment mit Peak 1-Fraktion ohne Phosphat) eine Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 20). Die Lineweaver-Burk-Auftragung ergibt eine Gerade (Abbildung 22).

Abb. 17 + 18: Einfluß der F-6-P- und UDPG-Konzentration auf die Aktivität der Saccharose-P-Synthetase
Proteinkonzentration: 30 µg (Peak 1-Fraktion)
UDPG (Abb.17): 15 mM, F-6-P (Abb. 18): 5 mM,
$MgCl_2$: jeweils 15 mM

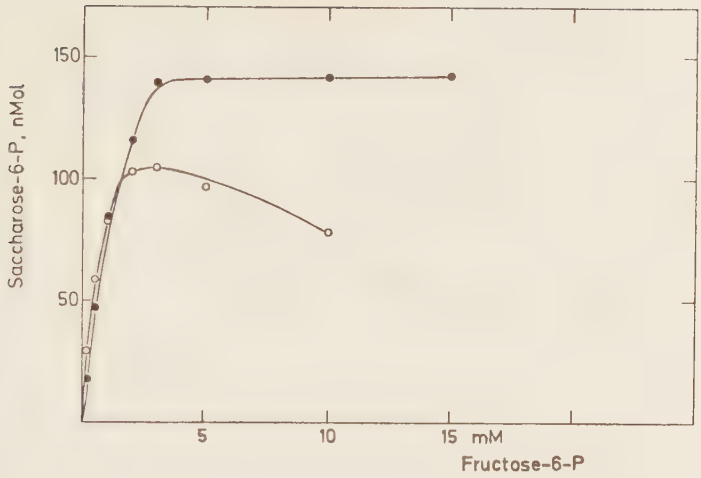


Abb. 19

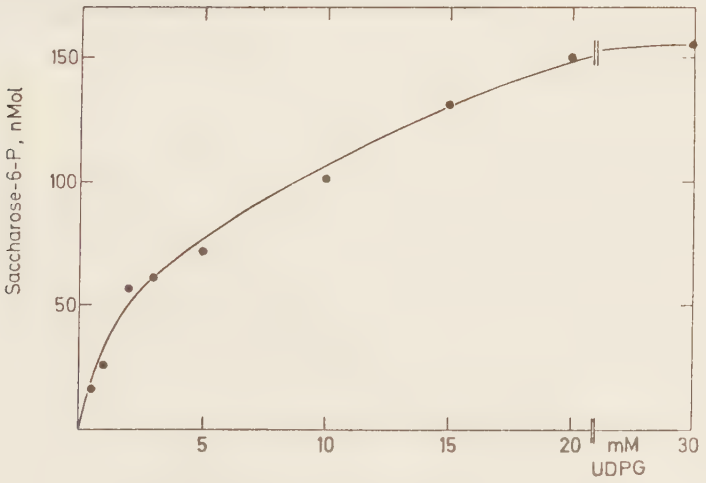


Abb. 20

Abb. 19 + 20: Einfluß der F-6-P- und UDPG-Konzentration auf die Aktivität der Saccharose-P-Synthetase
Proteinkonzentration: 17,5 /ug (Fr. 27-31)
UDPG: 25 mM, F-6-P : 5 mM, $MgCl_2$: 15 mM
●—● 25 mM Phosphat ○—○ 8,3 mM Phosphat

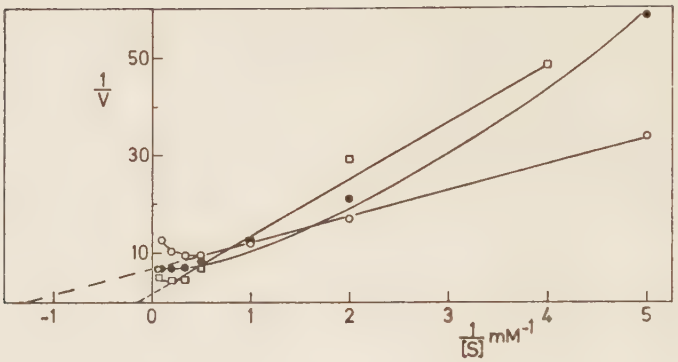


Abb. 21 : Lineweaver-Burk-Diagramm für das Substrat F-6-P

□——□ Peak 1-Fraktion (s. Abb. 17)

●——● Fr. 27 - 31, 25 mM Phosphat (s.Abb.19)

○——○ Fr. 27 - 31,8,3 mM Phosphat (s.Abb.19)

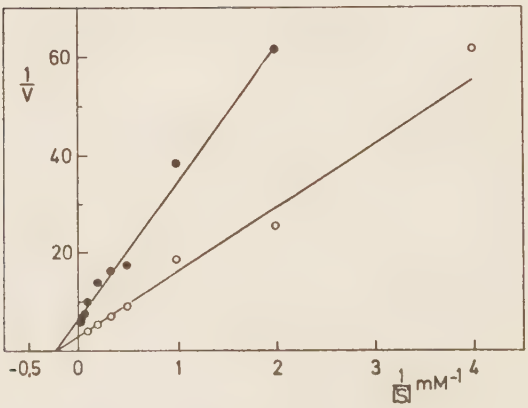


Abb. 22 : Lineweaver-Burk-Diagramm für das Substrat UDPG

○——○ Peak 1-Fraktion (s.Abb. 18)

●——● Fr. 27-31 , 25 mM Phosphat (s.Abb.20)

Die aus den Michaelis-Menten-, bzw. Lineweaver-Burk-Diagrammen graphisch bestimmten scheinbaren K_m-Werte, bzw. $S_{0,5}$-Werte für die beiden Substrate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Fraktion	K_m - Wert	
	F-6-P	UDPG
Peak 1	8,0 mM	4,2 mM
Fr. 27-31		
25 mM Phosphat	0,9 mM ($S_{0,5}$)	4,2 mM
8,3 mM "	0,8 mM	---
ohne "	0,3 mM	---

Tabelle 4: Michaelis-Konstanten der Saccharose-P-Synthetase für die Substrate F-6-P und UDPG

Die nachfolgende Abbildung 23 zeigt eine Hill-Auftragung für die beiden Substrate.

Der aus der Steigung der Geraden graphisch ermittelte Hill - Koeffizient ergibt für F-6-P einen Wert von 1,9. Dieser Wert bestätigt die schon aus der Lineweaver-Burk-Auftragung ersichtliche positive Kooperativität. Es muß daraus auf mindestens zwei Bindungsstellen für F-6-P am Enzym geschlossen werden.

Der für UDPG ermittelte Hill - Koeffizient von 1,05 und die gefundene Michaelis-Menten-Kinetik schließen eine Kooperativität für UDPG aus.

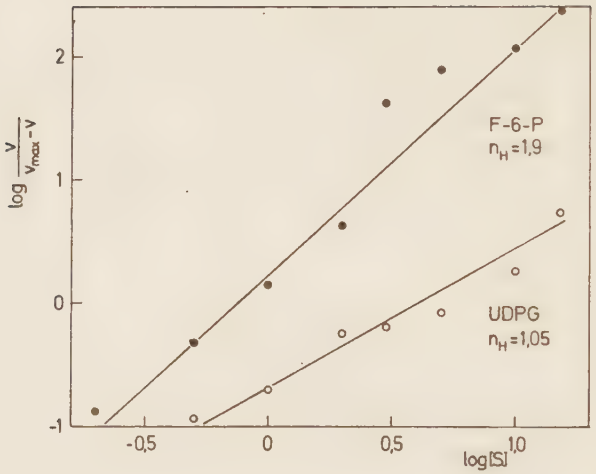


Abb. 23: Hill-Diagramm
Direkte graphische Bestimmung des Hill-Koeffizienten für das Substrat F-6-P und UDPG, Fr. 27-31, 25 mM Phosphat

3.9.4. Temperaturabhängigkeit der gereinigten Enzymfraktionen

Beide Fraktionen zeigen eine ähnliche Temperaturabhängigkeit. Bei Fraktion 27-31 liegt jedoch das Temperaturoptimum um etwa 5°C höher, bei 45,5°C.

Eine Erhöhung der Temperatur von 25° auf 45°C verursacht eine maximal etwa 3-fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit.

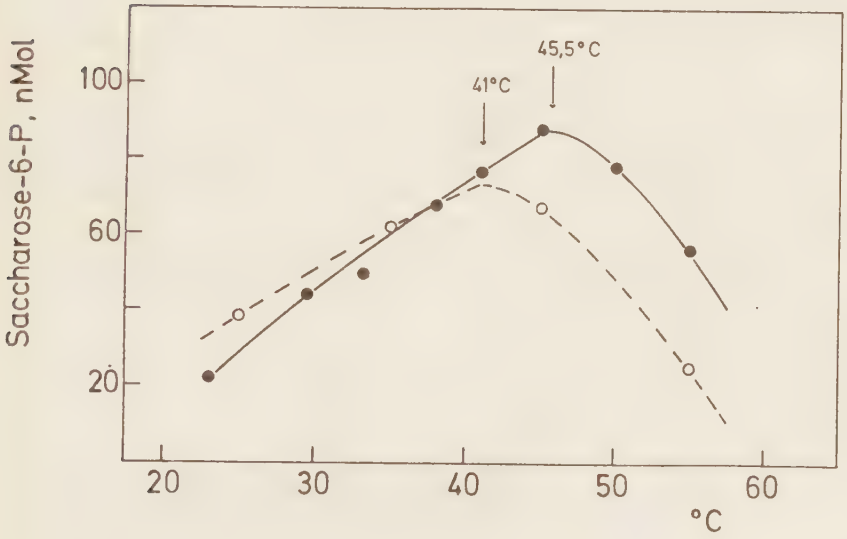


Abb. 24: Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität
O---O Peak 1-Fraktion (20 /ug)
●——● Fr. 27-31, 8,3 mM Phosphat (17,5 /ug)
UDPG: 25 mM, F-6-P: 5 mM, $MgCl_2$: 15 mM

3.9.5. Einfluß von NaCl auf die Enzymaktivität

Für diese Versuche wurde zu dem Testansatz (100 µl Gesamtvolumen) 50 µl einer NaCl-Lösung verschiedener Konzentrationen zugegeben (in Tricin-Puffer, 50 mM pH 7,5). Ansonsten wurde der Test in der üblichen Weise durchgeführt.

Das Versuchsergebnis zeigt die Abbildung 25.

Schon bei einer Konzentration von etwa 90 mM NaCl ist eine 50 %-ige Hemmung der Enzymaktivität zu beobachten. Bei 500 mM NaCl ist noch eine Restaktivität von ca. 10 % der Kontrolle vorhanden.

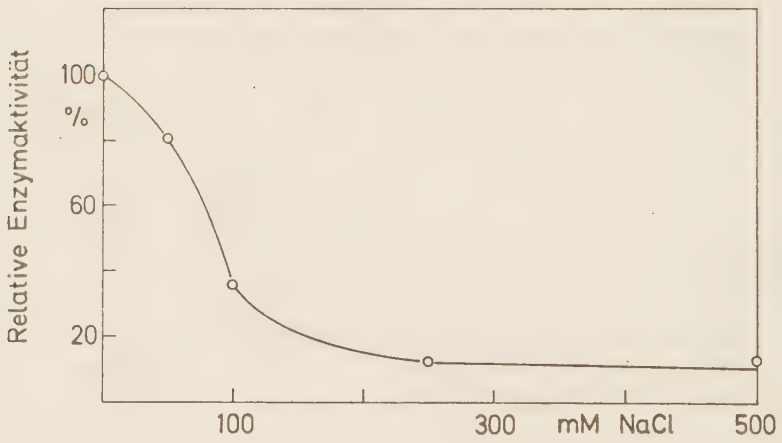


Abb. 25: NaCl-Abhängigkeit der Enzymaktivität
Proteinkonzentration: 20 µg (Peak 1-Fraktion)
UDPG: 10 mM, F-6-P: 3,4 mM, $MgCl_2$: 10 mM

3.10. ESR-Messungen an Spin-markierten Dunaliella-Zellen

Das Kontrollspektrum des im Nährmedium (pH 7,7) gelösten, ungebundenen Stearinsäure-Spinlabel zeigt die typischen 3 Linien des Nitroxid-Radikals im frei beweglichen (schwach immobilisierten) Zustand (Abbildung 26).

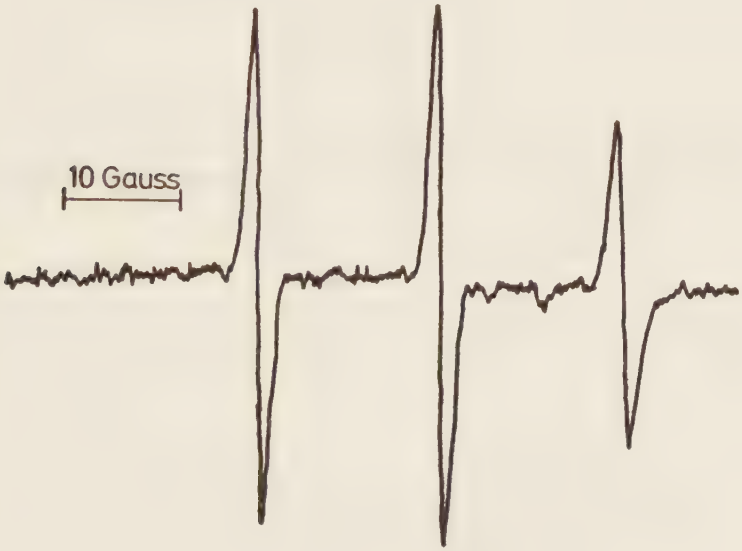


Abb. 26: ESR-Spektrum des im Nährmedium gelösten Stearinsäure-Spinlabel 618 (Syva)
Nährmedium: 2 % NaCl, mit 20 mM Tricin-NaOH auf pH 7,7 gepuffert
Feldstärke: 3320 G, Mikrowellenfrequenz: 9,23 GHz
Mikrowellenenergie: 10 mW, Modulationsfrequenz: 100 KHz
Modulationsamplitude: 1,25 G, Temperatur: 25°C

Nach der Inkorporation des Spinlabels in die Dunaliella-Zellen ergibt sich folgendes typisches Spektrum: (Abb. 27).

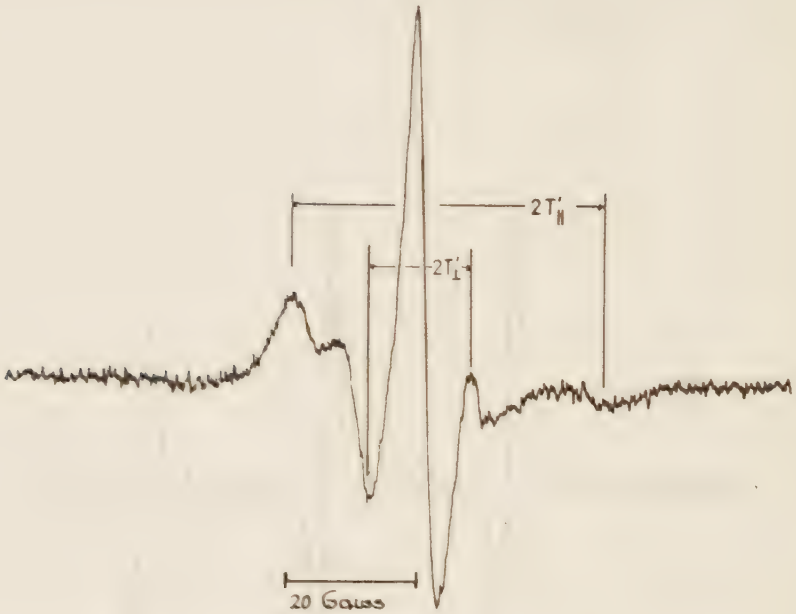


Abb. 27: ESR-Spektrum des in Dunaliella-Zellen inkorporierten Stearinsäure-Spinlabels 618
(Versuchsbedingungen und Gerätedaten s. Abb. 26)

Bezeichnet ist an diesem Spektrum das für die Auswertung maßgebende äußere und innere Linienpaar, mit dem Feldabstand 2 T'_{II} und 2 $T'_{\perp}$.
Die Auswertung der in den folgenden Versuchen erhaltenen ESR-Spektren erfolgte nach der von SEELIG (1970) und HUBBELL und MC CONNELL (1971) entwickelten halbempirischen Methode.

Die ESR-Spektren von Fettsäure-Spinlabel in Lipid-Doppelschichten und biologischen Membranen werden bestimmt durch die schnelle anisotrope Bewegung der Fettsäure-Moleküle, die dabei vorwiegend senkrecht zur Oberfläche der Membranen orientiert sind.
Sie besitzen eine Rotation um die Längsachse der Alkyl-Kette. Die Amplitude dieser Rotationsbewegung, die als Maß für die 'Fluidität' der Membran angesehen wird, kann durch den sogenannten Ordnungsparameter S charakterisiert werden.

Er wird durch Therme der beobachteten Spektren-Parameter folgendermaßen definiert:

$$S = \frac{T_{\parallel}' - T_{\perp}'}{T_z - T_x}$$

$T_z - T_x = 25$ Gauß (MC CONELL, FARLAND 1970)

In den folgenden Versuchen wurden ESR-Spektren von Spinmarkierten Dunaliella-Zellen im Temperaturbereich zwischen 16° und $50^{\circ}C$, bei drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen im Nährmedium aufgenommen.

Die folgende Abbildung 28 zeigt die Temperaturabhängigkeit des Spektrums bei einer 6 %-igen NaCl-Konzentration im Nährmedium. In dieser Meßreihe ist zwischen 32° und $40^{\circ}C$ ein deutlich stärkerer Abfall des Feldabstandes 2 T' (zwischen dem äußeren Linienpaar) zu erkennen.

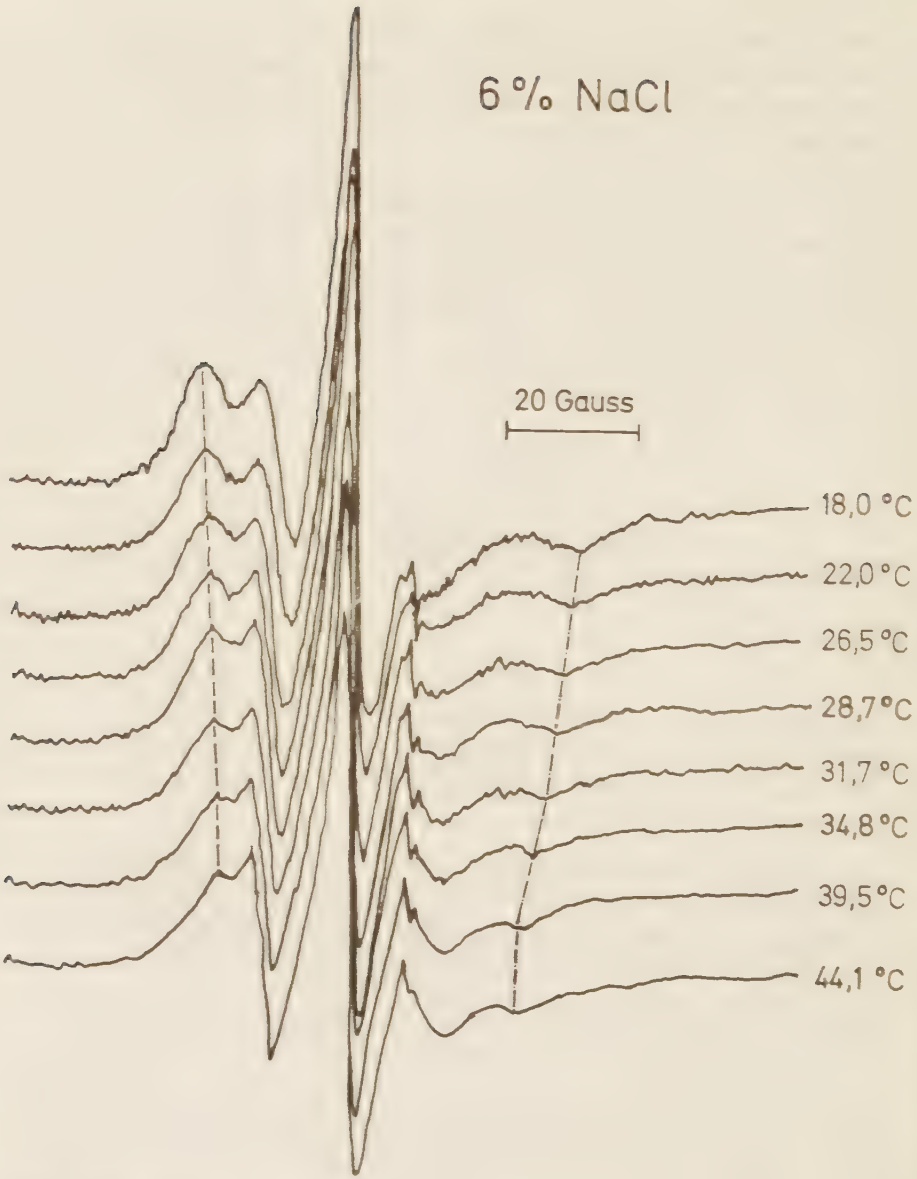


Abb. 18: Temperaturabhängigkeit des ESR-Spektrums des in Dunaliella-Zellen inkorporierten Stearinsäure-Spinlabels

In den Abbildungen 29 - 31 wurde der aus den Spektrenparametern ermittelte Ordnungsparameter S als Funktion der Temperatur aufgetragen.

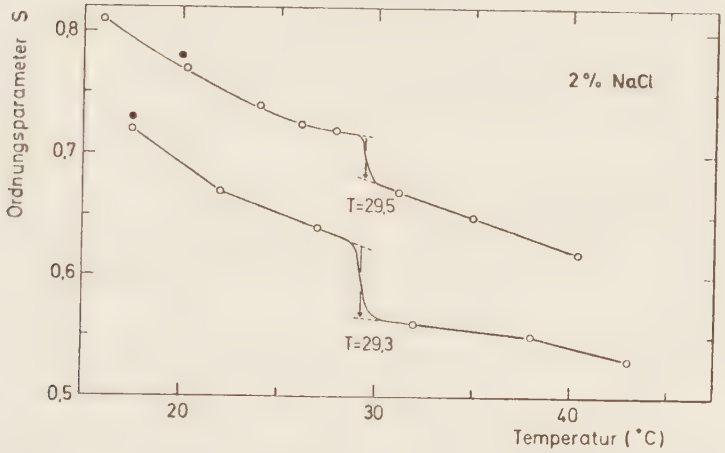


Abb. 29

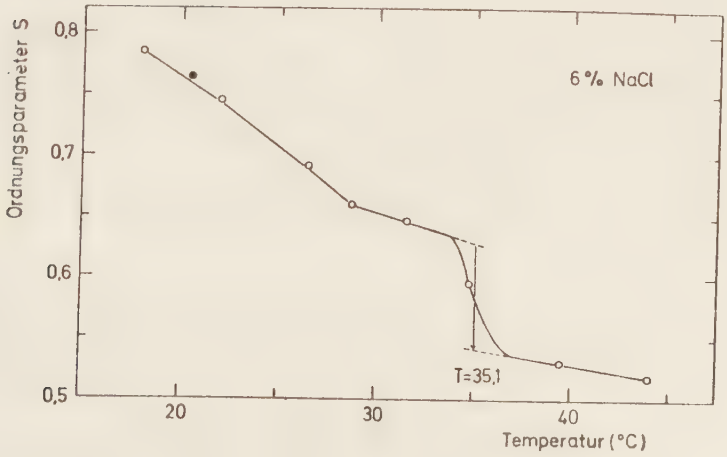


Abb. 30

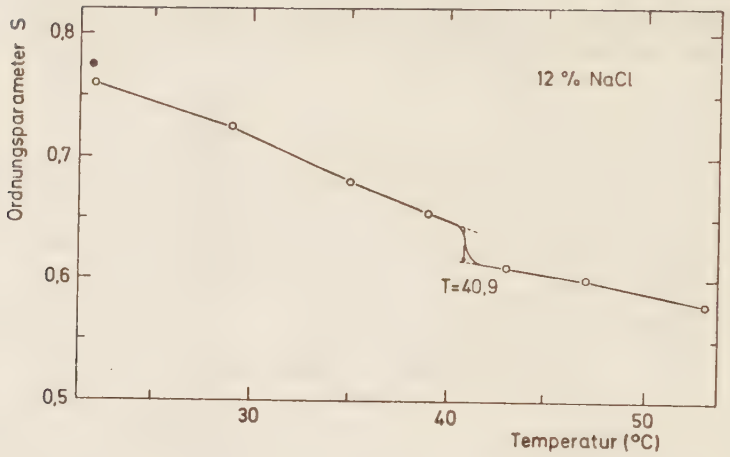


Abb. 31

Die Spektren zu Abbildung 29 (obere Kurve) und Abbildung 30 wurden mit einem Varian E-Line-Century-Spektrometer aufgenommen, die zu Abbildung 29 (untere Kurve) und Abbildung 31 mit einem Varian E-12 ESR-Spektrometer.
Die Temperaturen am Varian E-12 ESR-Spektrometer wurden mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Bei den Messungen am anderen Gerät wurden die Temperaturen innerhalb jeder Messreihe vor und nach jeder Messung direkt mit einem in die Küvettenhalterung eingeführten Thermometer gemessen.
Die Temperaturdifferenz zwischen beiden Messungen betrug maximal $0,5^{\circ}C$.

Entsprechend dem Verlauf der Spektren in Abbildung 28 ergibt sich in Abbildung 30 ein abrupter Abfall des Ordnungsparameters S zwischen ca. 34 und $37^{\circ}C$, um 0,1 Einheit von 0,635 auf 0,535. Der Wert bei $34,8^{\circ}C$ liegt mitten in diesem Abfall.

Die auf den Abbildungen bezeichneten Temperaturen (T) wurden graphisch ermittelt. Sie liegen dort, wo der senkrechte Ab-

stand zwischen der extrapolierten Kurve vor und nach dem Abfall durch die gemessene (bzw. gezogene) Kurve zweigeteilt wird.
Der Messpunkt (●) am oberen Beginn der Kurven gibt den Wert für S an, der nach Beendigung der Meßreihe (zwischen 40 und 54°C) beim Abkühlen in den Bereich der Ausgangstemperatur bei der entsprechenden Temperatur wieder erreicht wurde.

Er liegt bei allen Versuchen fast auf der gemessenen Kurve und gibt somit zumindest einen Hinweis auf die Reproduzierbarkeit der Meßreihe.
Eine Gesamtwiederholung der Meßreihen mit denselben Proben war nicht möglich, da nach dem Temperaturabfall von etwa 30°C die Intensität der Spektren stark nachließ und damit eine exakte Auswertung nicht mehr möglich war.

Dieser Effekt ist wohl in erster Linie auf eine Schädigung der Zellen und die damit verbundene Reduktion eines Großteils der Spin-Labelmoleküle zurückzuführen.

Bei 2 % NaCl wurden zwei unabhängige Meßreihen durchgeführt. Die Abbildung 29 zeigt bei beiden Versuchen einen abrupten Abfall des Ordnungsparameters S im Bereich zwischen 29 und 31°C. Der Abfall liegt zwischen 0,045 und 0,075 Einheiten.

Bei 12 % NaCl liegt der Abfall von S, der schwächer als bei den beiden niedrigeren NaCl-Konzentrationen ist (etwa 0,035 Einheiten), zwischen 40 und 41°C.

4. DISKUSSION

4.1. Physiologie der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella

Frühere Untersuchungen von WEGMANN (1968) zeigten, daß Saccharose ein früh markiertes Photosyntheseprodukt in Dunaliella ist. Schon nach 1 Minute Photosynthese bei 40°C waren etwa 17 % des angebotenen $^{14}CO_2$ in Saccharose eingebaut, nach 3 Minuten waren es über 40 %.
Durch Dunkelvorbehandlung der Zellen konnte der Anteil an Saccharose noch wesentlich gesteigert werden.
Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde nun die Physiologie der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella eingehender untersucht.
Die ^{14}C-Einbauversuche zeigen, daß Saccharose nur in einem bestimmten Temperaturbereich als Photosyntheseprodukt in nennenswertem Maße auftritt.
Die Lage dieses Temperatursbereichs wird von der NaCl-Konzentration des Nährmediums entscheidend beeinflußt. Für jede NaCl-Konzentration ist eine bestimmte Temperatur festzustellen, ab der die Einbaurate sprunghaft ansteigt. Diese Temperatur wird deshalb im Folgenden als sogenannte Sprungtemperatur bezeichnet.

Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration bewirkt eine Steigerung der Sprungtemperatur, ermöglicht also die photosynthetische Saccharoseproduktion erst bei höheren Temperaturen.
Im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 12 % NaCl liegt die Sprungtemperatur zwischen 25 und 35°C und erhöht sich pro Prozent NaCl um etwa 1°C. In der drei-dimensionalen Darstellung (Abbildung 4) ist dieser Verlauf am deutlichsten zu erkennen.
Der Temperaturkoeffizient (Q_{10}-Wert), berechnet aus den Einbauraten bei der jeweiligen Sprungtemperatur und 10°C darüber (Tabelle 1), liegt zwischen 19 und 25, und steigt mit zunehmender NaCl-Konzentration an.

Diese Q_{10}-Werte der Saccharose-Synthese liegen damit bedeutend über den normalerweise bei pflanzlichen Stoffwechselreaktionen gefundenen Werten. So liegt beispielsweise der Q_{10}-Wert für den enzymatischen Bereich der Photosynthese bei etwa 2 - 3, das heißt, eine Temperaturerhöhung um 10°C verursacht maximal eine Verdreifachung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Temperaturoptima der Saccharose-Synthese liegen jeweils etwa 10°C über der Sprungtemperatur. Eine weitere Erhöhung der Temperatur bewirkt dann eine mehr oder weniger schnelle Schädigung der Zellen und einen rapiden Abfall der Stoffwechselleistung. Eine steigende NaCl-Konzentration im Nährmedium erhöht also die Hitzestabilität der Zellen.

Die in den anschließenden Experimenten durchgeführten quantitativen enzymatischen Bestimmungen des Saccharosegehaltes der Zellen, nach Photosynthese bei den Optimaltemperaturen der Saccharose-Synthese, bestätigen und untermauern die obigen Ergebnisse. (Abbildung 5 und 7).

Die aus den Versuchen zu Abbildung 6 errechneten Q_{10}-Werte, aus dem Saccharosegehalt der Zellen bei 25°C und den nach 24 Stunden Photosynthese bei 35°C erreichten Werten, ergeben folgendes Bild:

NaCl-Konzentration des Nährmediums	Saccharosekonzentration in den Zellen (mM)		Q_{10}-Wert
	25°C	35°C	
2 %	4,5	65,8	14,6
6 %	1,6	31,0	19,4
9 %	0,64	11,8	18,4
12 %	1,9	3,9	2,1

Daraus ist ersichtlich, daß bei NaCl-Konzentrationen im Nährmedium von 9 % und darunter, bei 35°C die Sprungtemperaturen der Saccharose-Synthese überschritten sind und sehr hohe Q_{10}-Werte erreicht werden.

Bei 12 % NaCl ist bei 35°C die Sprungtemperatur noch nicht überschritten und es ergibt sich die für biochemische Reaktionen bekannte Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit.
Erhöht man jedoch hier die Temperatur auf 45°C, so ergibt sich nach 24 Stunden Photosynthese (Abbildung 5) eine Saccharosekonzentration in den Zellen von etwa 160 mM. Daraus errechnet sich ein Q_{10}-Wert (35/45) von 41.

Solche Temperaturkoeffizienten, wie sie nach Überschreiten der Sprungtemperatur auftreten, können nur durch eine Beteiligung physikalischer Vorgänge, die im Bereich der Sprungtemperatur ablaufen müssen, erklärt werden.

Für Zellen in einem Nährmedium mit 6 % NaCl ergibt sich bei der Optimaltemperatur von 40°C nach 10 Stunden Photosynthese eine Saccharosekonzentration von ca. 100 mM, (die sich, wie nach dem Kurvenverlauf zu schließen, nach 24 Stunden um maximal 20 % steigern würde).

Damit kann man neben der thermischen Regulation der Saccharose-Synthese eine osmotische Beeinflußung in zweierlei Hinsicht beobachten: Eine ansteigende NaCl-Konzentration im Nährmedium erhöht a) die Sprungtemperatur der Saccharose-Synthese, (von ca. 25°C bei 2 % auf ca. 35°C bei 12 %)
und b) die Saccharosekonzentration der Zellen bei der jeweiligen Optimaltemperatur.

Die Syntheserate liegt allerdings bei 6 % NaCl am höchsten und beträgt 4,5 nMol Saccharose/Stunde x 10^6 Zellen.

Durch die Versuche zur Saccharose-Synthese im Dunkeln konnte gezeigt werden, daß auch bei Ausschaltung der Photosynthese noch etwa 50 %-ige Syntheseraten erreicht werden. Sie müssen demnach auf dieselben Prozesse wie im Licht zurückgeführt werden.
Die bei Verdunklung der Lichtkultur und Belichtung der Dunkel-

kultur zu beobachtende Zunahme, bzw. Abnahme im Saccharosegehalt der Zellen ist wohl in erster Linie auf die Volumenabnahme (bei Verdunklung), bzw. Volumenzunahme (bei Belichtung) zurückzuführen (Abbildung 7).

Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, daß die Saccharoseproduktion nicht ausschließlich an die Bereitstellung von Substraten aus der photosynthetischen CO_2-Fixierung gebunden ist. Denn sonst müßte die Synthese bei Verdunklung zum Erliegen kommen.

Die Abbildung 8 deutet darauf hin, daß die Substrate für die Dunkelsynthese aus dem Abbau des Hauptreservekohlenhydrates Stärke stammen müssen.
Für die Saccharose-Synthese in Duanliella müssen demnach zwei Stoffwechselwege existieren.

4.2. Biosynthesewege der Saccharose in Dunaliella

a) Im Licht

Unter den Bedingungen der Photosynthese können die Vorstufen direkt über den Calvin-Zyklus geliefert werden.
Substrate der Biosynthese sind die Triosephosphate Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. In Gegenwart der Triose-P-Isomerase befinden sie sich im Gleichgewicht und unterliegen einer Aldol-Kondensation zu Fructose-1,6-diphosphat, die durch die Aldolase katalysiert wird. Aus diesem entsteht in Gegenwart der FDPase Fructose-6-phosphat, als das eine Substrat der Saccharose-P-Synthetase-Reaktion.

Aus Fructose-6-P entsteht über Glucose-6-P Glucose-1-P, das in der Pyrophosphorylase-Reaktion in Gegenwart von UTP in UDP-Glucose umgewandelt wird. Durch diese 'aktivierte' Glucose wird in der S-P-Synthetase-Reaktion der Glucosyl-Rest auf F-6-P übertragen. Durch eine spezifische Phosphatase wird der Phosphat-Rest von Saccharose-P abgespalten und es entsteht das Endprodukt Saccharose.

Dieser beschriebene Biosynthese-Weg (unter Beteiligung der

S-P-Synthetase und S-P-Phosphatase) wird heute als der Hauptweg für die Saccharoseproduktion in photosynthetisierenden Zellen und Gewebe angesehen.
LELOIR und CARDINI (1955) waren die ersten Autoren, die in Extrakten von Weizensamen zwei Enzyme nachwiesen, die die Saccharose-Synthese durch die Übertragung eines Glucosylrestes von UDP-Glucose auf Fructose, bzw. Fructose-6-P katalysieren.

Die Alternativmechanismen wurden von ihnen folgendermaßen formuliert:

1) a) Fructose-6-P + H_2O ⟶ Fructose + P_i

b) UDPG + Fructose ⇌ Saccharose + UDP

2) a) UDPG + Fructose-6-P ⇌ Saccharose-P + UDP

b) Saccharose-P ⟶ Saccharose + P_i

Die Existenz dieser beiden Alternativwege mit den Enzymen Saccharose-Synthetase und Saccharose-P-Synthetase warf die Frage nach ihrer physiologischen Bedeutung in der Biosynthese bzw. dem Stoffwechsel von Saccharose auf.

MENDICINO (1960) lieferte dafür die ersten Hinweise. Er ermittelte an der 220-fach gereinigten Saccharose-P-Synthetase aus Weizenkeimen eine Gleichgewichtskonstante (in Richtung Saccharose-P-Synthese) von 3250 bei pH 7,5, und von 53 bei pH 5,5 (jeweils bei 38°C). Außerdem konnte er eine für Saccharose-P spezifische Phosphatase in einer teilweise gereinigten Enzympräperation nachweisen. Ist die Saccharose-P-Synthetase-Reaktion mit dieser Phosphatase gekoppelt, verläuft die Biosynthese von Saccharose praktisch irreversibel.

Im Gegensatz dazu besitzt die Saccharose-Synthetase nach CARDINI, LELOIR und CHIRIBOGA (1955) eine Gleichgewichtskonstante von maximal 8 bei pH 7,4 und ist frei reversibel.

Untersuchungen von DELMER (1972) an einer aus Phaseolus aureus isolierten und bis zur Homogenität gereinigen Saccharose-Synthetase ergaben eine Gleichgewichtskonstante (in Richtung UDP-Glucose-Synthese) von 0,15 (bei pH 7,5 und 25°C) und bestätigen damit obige Ergebnisse von CARDINI et al.

Im Gegensatz zur Saccharose-P-Synthetase ist dieses Enzym nicht spezifisch für UDP-Glucose, sondern kann auch andere Nucleosid-diphosphoglucose-Derivate umsetzen. Die Aktivität mit ADP-Glucose ist am höchsten und beträgt 28 % (UDP-Glucose = 100 %), GRIMES et al. (1970).

Diese Untersuchungen lassen auf folgende Funktionen der beiden Enzyme schließen:

- Die Saccharose-P-Synthetase, zusammen mit der Saccharose-P-Phosphatase sind die Hauptentzyme für die Biosynthese der Saccharose aus den Produkten der photosynthetischen CO_2-Fixierung.
- Die Hauptfunktion der Saccharose-Synthetase ist die Katalyse der Synthese der verschiedenen Nucleosid-diphosphoglucose-Derivate aus Saccharose in nicht photosynthetisierenden Geweben. Das Enzym hat damit neben der Invertase eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Saccharose dieser Gewebe.

Durch die eigenen Untersuchungen konnten die obengenannten Ergebnisse auch für Dunaliella bestätigt werden: Die Saccharose-P-Synthetase ist das Schlüsselenzym für die Saccharose-Synthese in Dunaliella. Eine Aktivität einer Saccharose-Synthetase in Richtung Saccharose-Synthese konnte nicht nachgewiesen werden.

Frühere Untersuchungen von WEGMANN (1968) legten schon den Schluß nahe, daß die Saccharose-Synthese in Dunaliella in direkter Verbindung zur photosynthetischen CO_2-Fixierung steht. Schon nach einer Minute Photosynthese konnte ein be-

trächtlicher Teil des angebotenen $^{14}CO_2$ in Saccharose nachgewiesen werden. Bei längerer Photosynthese steigt sein Anteil vor allem auf Kosten der Zuckerphosphate.

Damit kann auch für Dunaliella der oben beschriebene Biosyntheseweg für Saccharose, mit der nachgewiesenen Saccharose-P-Synthetase als Hauptenzym, im Licht ausgehend von den durch den Calvin-Zyklus produzierten Triosephosphaten, angenommen werden.

b) Im Dunkeln

Für die im Dunkeln nachgewiesenen Saccharose-Synthese scheiden Produkte des Calvin-Zyklus als Substrate aus.

Die Versuche zum Einfluß der Dunkelzeit auf die Saccharose-Synthese (Abbildung 8) zeigen eine nach etwa 12 Stunden Dunkelzeit schnell abfallende Syntheseleistung der Zellen.

Da die Dunkelfixierung von CO_2 auch bei 40°C nur 3 bis 4 % des Umsatzes der Photosynthese ausmacht (WEGMANN 1968), war mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die Substrate für die Saccharose-Dunkelsynthese aus dem Abbau des Hauptreservekohlenhydrates Stärke stammen müssen.

Die nach 12 Stunden Dunkelvorbehandlung schnell fallende Syntheseleistung der Zellen (bei 40°C im Dunkeln) ist durch eine Substratverarmung - die Stärke-Synthese ist von der Photosynthese-Produktion abhängig - gut erklärbar.
Auf eine erst nach 12 Stunden Dunkelzeit einsetzende Hemmung von Enzymen der Biosynthesekette kann dieses Ergebnis wohl kaum zurückgeführt werden.

Somit ist also anzunehmen, daß im Dunkeln, oberhalb der jeweiligen Sprungtemperatur die in den Chloroplasten lokalisierte Speicherstärke für die Saccharose-Synthese mobilisiert werden kann. Als Abbauweg für die Stärke auf das Niveau der Triosephosphate kommt sowohl der oxydative Pentose-Phosphat-Zyklus (BASSHAM 1971) als auch der Abbau über die Phosphofructokinase (KELLY, LATZKO, 1975) und

Aldolase-Reaktion in Betracht.

4.3. Ort der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella

Eindeutige Beweise für den Ort der Saccharose-Biosynthese konnten aus eigenen Untersuchungen nicht erbracht werden. Die Versuche zur Isolierung reiner Fraktionen intakter Chloroplasten aus Dunaliella, die für solche Untersuchungen die Voraussetzungen gewesen wären, brachten nicht den gewünschten Erfolg.
Doch ergaben sich auch aus den vorliegenden Versuchen zumindest Hinweise darauf.
So trat bei der Verwendung von Saccharose-Dichtegradienten (wo Saccharose-Konzentrationen von über 1 M eingesetzt werden müssen) zur Reinigung von 'Chloroplasten-Fraktionen' eine starke Schrumpfung der Chloroplasten auf und bei der weiteren Aufarbeitung in Medien geringerer Tonizität konnte ein Zerreißen zumindest der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran beobachtet werden.
Saccharose wirkt somit auf Dunaliella-Chloroplasten als Osmotikum und kann zumindest die innere Chloroplasten-Hüllmembran nicht permeieren.
Dies steht im Einklang mit eingehenden Untersuchungen von HELDT und SAUER (1971), die eine Undurchlässigkeit der inneren Chloroplasten-Hüllmembran (von Spinat-Chloroplasten) für Saccharose nachwiesen.

Könnte also Saccharose im Chloroplasten-Stroma synthetisiert werde, so wäre ein Transport in andere Zellkompartimente damit unterbunden.
Damit wäre aber unvereinbar, daß schon nach kurzer Photosynthese-Dauer mit $^{14}CO_2$ eine Ausscheidung markierter Saccharose aus intakten Dunaliella-Zellen in das Nährmedium nachgewiesen werden konnte (WEGMANN 1968 und eigene Untersuchungen).

Die Theorie, daß Saccharose als Endprodukt der Photosynthese in den Chloroplasten synthetisiert und von da in andere Zellkompartimente transportiert wird, war lange Zeit allgemein akzeptiert, obwohl seine Effektivität als Osmotikum bekannt war. Dazu trugen verschiedene Untersuchungen an isolierten Chloroplasten bei.
EVERSON, COCKBURN und HIBBS (1967) berichteten über den Nachweis von Saccharose als Photosynthese-Endprodukt in isolierten Spinat-Chloroplasten.
Von mehreren Autoren wurden Enzyme der Saccharose-Biosynthesekette, einschließlich der Saccharose- und Saccharose-P-Synthetase in isolierten Chloroplasten aus Zuckerrüben-, bzw. Tabakblättern nachgewiesen (HAQ und HASSID 1965, BIRD, PORTER und STOCKING 1965).
Zumindest die Ergebnisse der zuletzt genannten Autoren wurden auf eine irrtümliche Interpretation der bei der Chloroplasten-Isolation in nichtwässrigem Medium erhaltenen Enzymaktivitäten und auf eine Verunreinigung der Chloroplasten mit Cytoplasma zurückgeführt (BIRD et al. 1973, 1974).

Ebenfalls gibt es Anhaltspunkte dafür, daß die von EVERSON et al. erhaltenen Ergebnisse auf eine die Spinat-Chloroplasten umgebende Schicht von Cytoplasma zurückzuführen sind. In Verbindung mit dieser Cytoplasma-Hülle sind die Chloroplasten zu einer effektiven Saccharose-Synthese befähigt (LARSON, ALBERTSSON 1974).

Auf Grund dieser Erkenntnisse mußte der Chloroplast als Syntheseort stark in Zweifel gezogen werden.
Erste Hinweise auf das Cytoplasma als Hauptsyntheseort für Saccharose lieferten schon 1964 HEBER und WILLENBRINK durch Gefriertrocknung und nichtwässrige Fraktionierung von Chloroplasten. Der Beweis, daß die innere Chloroplasten-Hüllmembran für Saccharose undurchlässig ist (HELDT, SAUER), zusammen mit dem Nachweis, daß die Enzyme UDP-Glucose-Pyrophosphorylase, Saccharose-P-Synthetase (BIRD et al. 1974) und Fructose-diphosphatase (LATZKO et al. 1974) haupt-

sächlich oder ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert sind, führten zu der heute akzeptierten Auffassung, daß Saccharose im Cytoplasma aus Triose-Phosphaten, die aus dem Chloroplasten exportiert werden, synthetisiert wird (KELLY et al., 1976).

Trifft diese Auffassung auch für Dunaliella, was zumindest für den Syntheseort stark anzunehmen ist, zu, so muß auf Grund der beobachteten hohen Saccharose-Syntheseraten im Licht wie im Dunkeln eine hohe Aktivität besonders der cytoplasmatischen Fructose-diphosphatase angenommen werden, die ja eine Verzweigungsstelle zwischen Glykolyse und Saccharose-Synthese darstellt.
Von FRANK (1972) wurde neben anderen auch die (Gesamt)Aktivität dieses Enzyms in Dunaliella untersucht. Sie liegt mit 14 /uMol/mg Chlorophyll x Stunde (bei pH 8,8) äußerst niedrig und bei nur 3 % der photosynthetischen CO_2-Fixierung.

Dieser Befund spricht damit gegen eine Saccharose-Synthese mit den beobachteten hohen Raten, ausgehend von in das Cytoplasma exportierten Triose-Phosphaten.

Eine durch die Temperaturerhöhung hervorgerufene Strukturveränderung der Chloroplasten-Hüllmembran, die zu einer Permeabilität (bzw. stark erhöhten Permeabilität) für Hexose-Phosphate, im besonderen Fructose-6-P führt, würde die Saccharose-Synthese oberhalb der Sprungtemperatur ermöglichen.
Damit wäre eine direktere Verfügbarkeit der Vorstufe und des Substrates Fructose-6-P für die Saccharose-P-Synthetase gegeben.

Die Untersuchungen an der aus Dunaliella isolierten und gereinigten Saccharose-P-Synthetase sollten über den Einfluß der Substratkonzentrationen, aber auch der Temperatur und NaCl-Konzentration auf die Enzymaktivität Aufschluß geben.

4.4. Eigenschaften der Saccharose-P-Synthetase

a) Substratregulation

Die vorliegenden Untersuchungen zur Reinigung und Charakterisierung der Saccharose-P-Synthetase aus Dunaliella geben Hinweise auf eine in vivo allosterische Regulation des Enzyms durch Fructose-6-P. Bei dem nach der Methode a) (siehe Seite 49) durchgeführten Reinigungsverfahren erhält man die maximale Aktivität nur, wenn sowohl die Gelfiltration wie die anschließende Entsalzung (der mit Ammoniumsulfat gefällten aktiven Fraktionen) in 50 mM Phosphat-Puffer (höhere Konzentrationen wurden nicht eingesetzt) durchgeführt wird. Wir d die so erhaltene Enzympräperation für den Aktivitätstest eingesetzt (was eine Endkonzentration von 25 mM Phosphat ergibt), so erhält man für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der F-6-P-Konzentration eine sigmoide Sättigungskurve und einen Kooperativitäts-Koeffizient für F-6-P von $n_H = 1,9$ (Abbildung 19 + 23). Dies Bedeutet, daß F-6-P gleichzeitig als Aktivator wirken kann und auf Grund der positiven Kooperativität kleine Veränderungen der F-6-P-Konzentration (vor allem im unteren Konzentrationsbereich) zu großen Aktivitätssteigerungen des Enzyms führen können.

Wird jedoch bei der abschließenden Entsalzung (und damit auch im Enzymtest) die Phosphatkonzentration auf ein Drittel reduziert, so bekommt die Substratsättigungskurve für F-6-P eine hyperbolischen Verlauf und es ist keine Kooperativität mehr festzustellen, ebenso wie bei Abwesenheit von Phosphat. Dann sinkt gleichzeitig die maximale Reaktionsgeschwindigkeit stark ab (auf etwa ein Drittel).

Durch Zugabe von Phosphat zu diesem Präparat (8,3 mM, höhere Konzentrationen hemmen) kann eine Reaktivierung um maximal 20 % erreicht werden.

Dies deutet auf eine starke Instabilität des gereinigten

Enzyms in vitro bei Abwesenheit von Phosphat hin. Bestätigt wird dies durch einen 90 %-igen Aktivitätsverlust dieser Präperation innerhalb von 4 Tagen (bei 4°C). Die Anwesenheit von Phosphat erhöht den K_m-Wert für F-6-P und vermindert damit die Affinität des Enzyms zu diesem Substrat. Gleichzeitig wird jedoch der Substratumsatz am Enzym gesteigert.

Die Ergebnisse können so gedeutet werden, daß nur bei einer bestimmten Phosphat-Konzentration das Enzym in vitro so stabilisiert wird, daß die Anlagerung von F-6-P an das regulatorische Zentrum (bzw. Untereinheit) eine Konformationsänderung am katalytischen Zentrum herbeiführen kann. Dies führt dann zu einer Steigerung der Umsatzrate und die Affinität des Enzyms zu F-6-P erhöht sich bei steigender Konzentration des Substrats.
Vergleicht man die Eigenschaften der nach Verfahren a) und b) gereinigten Enzympräperationen, so ergibt sich für die letztere (Peak 1-Fraktion) eine für das Substrat F-6-P hyperbolische Kinetik, mit einer doppelt so hohen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (bestimmt aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm).
Dies könnte darauf hindeuten, daß durch die Ionenaustauschchromatographie eine regulatorische Untereinheit abgespalten wurde, das Restmolekül deshalb durch F-6-P nicht mehr regulierbar ist, jedoch eine höhere katalytische Aktivität als das Gesamtmolekül besitzt.

Damit wären auch die für die beiden Präperationen identischen Eigenschaften gegenüber dem Substrat UDPG, aber die ca. 10-fach höhere Affinität des Gesamtmoleküls (Fr. 27-31, durch 25 mM Phosphat stabilisiert) gegenüber F-6-P erklärbar.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, daß aus Dunaliella Präperationen der Saccharose-P-Synthetase gewonnen werden können, die durch F-6-P allosterisch reguliert werden. Eine entsprechende Regulation durch das Substrat UDPG konnte nicht nachgewiesen werden.

In der folgenden Tabelle sind die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse anderer Autoren zur Regulation dieses Enzyms zusammengestellt.

DE FEKETE (1971) weist hinsichtlich der sich zum Teil widersprechenden Ergebnisse der verschiedenen Autoren auf den Einfluß der Gegenwart, bzw. des Fehlens eines Aktivators in der Enzympräparation hin. Dies basiert auf ihren eigenen Untersuchungen, die zeigten, daß das Enzym bei Abwesenheit des Aktivators sigmoide Substratsättigungskurven zeigte und für beide Substrate positive Kooperativität festzustellen war. Im Gegensatz dazu ergaben sich sowohl bei Gegenwart des natürlichen Aktivators, wie des 'künstlichen' Aktivators Citrat hyperbolische Kurven und es war keine Kooperativität mehr festzustellen.

Die eigenen bis jetzt vorliegenden Untersuchungen lassen keinen zwingenden Schluß auf die Existenz, bzw. den Einfluß eines natürlichen Aktivators neben F-6-P zu. Doch lassen sie erkennen, daß anorganisches Phosphat auf die Enzympräparation (nach Verfahren a)) einen stabilisierenden und aktivierenden Einfluß besitzt.

b) Einfluß von Temperatur und NaCl-Konzentration

Die Ergebnisse zeigen, daß die getesteten Enzymfraktionen ein Temperaturoptimum zwischen 41 und 46°C besitzen.

Eine Temperaturerhöhung um 10°C ergibt eine Maximal 2,1-fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit (25 auf 35°C).
Die bei den physiologischen Messungen nachgewiesene bis zu 40-fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit kann also, wie schon in Kap. 4.1. festgestellt, nicht durch eine temperaturbedingte Aktivitätssteigerung des Enzyms selbst erklärt werden.

Das Enzym unterliegt, wie schon von FRANK (1972) für andere Enzyme aus Dunaliella nachgewiesen, einer relativ starken Hemmung durch ansteigende NaCl-Konzentrationen.

Autor	Organismus	Reinigung (spez. Akt.)	K_m-Wert ($s_{0,5}$) F-6-P	UDPG	Kinetik
LELOIR,CARDINI (1955)	Weizen-Samen	5,5 -fach (0,04 U)	2,2 mM	---	hyperbolisch
MENDICINO (1960)	Weizen-Samen	220 - fach (1,1 U)	3,0 mM	7,4 mM	"
SLABNIK et al. (1968)	Kartoffelknolle	?	5,5 mM	7,4 mM	"
PREISS,GREENBERG (1969)	Weizen-Samen	(1,4 U)	(2,6 mM(+$MgCl_2$) (3,4 mM(-$MgCl_2$)	0,67mM(+)) 1,90mM(-))	sigmoid
DE FEKETE (1971)	Vicia faba-Kotyledonen	130 - fach (0,63 U)	a) 1,4 mM 6,3 mM(+Citr.)	3,9 mM 19,8 mM(+)	hyperbolisch
			b)(4,3 mM) 1,4 mM(+Citr.)	(9,8 mM) 4,6 mM(+)	sigmoid hyperbolisch
		Anmerkung: a): Aktivator - gebundenes Enzym b): Aktivator - freies Enzym			
MURATA (1972)	Süßkartoffel-Wurzel	(0,24 U)	0,6 mM	5,4 mM	
	Kartoffel-Knolle	(0,2 U)	0,9 mM	2,5 mM	
	Gerste	(0,11 U)	1,8 mM	2,7 mM	jeweils für F-6-P sigmoid und für UDPG hyperbolisch
	Raps	(0,07 U)	1,3 mM	4,2 mM	
	Ladino Klee	(0,09 U)	0,6 mM	3,0 mM	
OMURA,AKAZAWA (1974)	Reis-Samen	10 -fach (2,3 U)	2,0-5,9 mM	25 mM	hyperbolisch

Tabelle 5 : Ergebnisse anderer Autoren zur Reinigung und den Eigenschaften der Saccharose-P-Synthetase

4.5. Membraneigenschaften der Dunaliella-Zellen

Die vorausgegangenen Untersuchungen zeigten die Möglichkeit der Regulation der Saccharose-P-Synthetase aus Dunaliella über eine Veränderung der Substratkonzentration, speziell von Fructose-6-P auf. Eine Steigerung der F-6-P-Konzentration im Cytoplasma etwa von 0,1 auf 0,5 mM könnte eine 25-fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit hervorrufen.

Die Höhe der Q_{10}-Werte, die bei der rapiden Steigerung der Saccharose-Synthese oberhalb der Sprungtemperaturen auftreten, legen die Beteiligung physikalischer Prozesse zwingend nahe. Wie oben auch gezeigt werden konnte, liegt die Temperaturabhängigkeit der Enzymkatalyse im Bereich der für biochemische Reaktionen bekannten Werte (Q_{10}-Werte zwischen 1,4 bis 2,1).

Seit etwa 10 Jahren ist bekannt, daß in biologischen Membranen durch Veränderung äußerer Faktoren Strukturumwandlungen ausgelöst werden können, die zu einer Funktionsänderung der Membran führen. Diese Schaltprozesse wurden vor allem in Zusammenhang mit der Reizleitung in Nerven diskutiert. Dabei sind die Membranlipide von besonderem Interesse, da sie thermische Phasenumwandlungen zeigen.

Durch kalorimetrische Messungen konnte gezeigt werden, daß hochmolekulare Lipidstrukturen bei Temperaturerhöhung eine in erster Näherung reversible Strukturumwandlung vom Charakter einer kristallinen-flüssig/kristallinen Phasenumwandlung durchmachen (CHAPMANN 1965).

Oberhalb dieser Umwandlung besitzen die Kohlenwasserstoffketten eine wesentlich höhere Beweglichkeit. Die Umwandlungstemperaturen liegen im allgemeinen weit unterhalb des kapillaren Schmelzpunktes der untersuchten Substanzen. Sie werden durch die Länge der Kohlenwasserstoff-Ketten, die Zahl der Doppelbindungen und die Struktur der polaren Gruppen beeinflußt (TRÄUBLE 1971).

Diese Strukturveränderung kann sich auf die Permeabilität der biologischen Membranen auswirken, da diese ja solche Lipid-Doppelschichten besitzen.
Es lag also nahe zu untersuchen, ob Membranen der Dunaliella-Zelle in dem für die sprunghafte Steigerung der Saccharose-Synthese maßgebenden Temperaturbereich solche Strukturveränderungen zeigen.

Die Phasenumwandlungen können optisch mit Hilfe geeigneter Fluoreszens- oder Absorptionsindikatoren nachgewiesen werden, die an die polaren Gruppen der Lipide gebunden werden. Sie zeigen im Bereich der Phasenumwandlung eine starke Fluoreszens- bzw. Absorptionsänderung. Diese Indikatoren waren jedoch für die geplanten Untersuchungen wegen der zu erwartenden Interferenz mit der Chlorophyllfluoreszens nicht einsetzbar.
Eine Isolierung von Membranfraktionen aus Dunaliella erschien für die Untersuchungen ebenfalls nicht geeignet, da dabei mit einer Veränderung der Membranstrukturen gegenüber dem in vivo Zustand hätte gerechnet werden müssen.

Seit 1968 von HUBBELL und MC CONELL die Methode der ESR-Spektroskopie zu Untersuchung von Membranen eingesetzt wurde, untersuchten verschiedene Autoren mit Hilfe von Nitroxid-Spinmarkern die Eigenschaften biologischer Membranen (KEITH et al. 1973, SACKMANN et al. 1973, MILLER, DE LA ROCHE 1976, NIKAIDO et al. 1977).

Als Nachweis für das Auftreten von Phasenumwandlungen dienten bei dieser Methode Diskontinuitäten in der Temperaturabhängigkeit der Rotations-Korrelationszeit, der Linienbreit und des sogenannten Ordnungsparameters.
In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Stearinsäure-Nitroxid-Label 618 eingesetzt und in lebende Dunaliella-Zellen inkubiert.
Auf Grund des Fehlens einer Zellwand bei Dunaliella (TREZZI et al. 1965) und der hohen Permeabilität der einschichtigen Plasmamembran konnte angenommen werden, daß das Stearinsäure-Derivat relativ leicht in die Zellen aufgenommen wird.

Der Vergleich der ESR-Spektren von Spin-markierten Zellen mit denen des Spin-Labels in wässriger Lösung zeigt, daß ein Einbau des Labels in den Zellen vorliegen muß.

Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die Ermittlung des Ordnungsparameters S.

Bei allen Versuchen tritt eine deutliche Diskontinuität in der Temperaturabhängigkeit des Ordnungsparameters auf, mit einer Verschiebung zu höheren Temperaturen bei ansteigender NaCl-Konzentration im Nährmedium. Neben diesen deutlichen Diskontinuitäten ergeben sich zumindest bei 2 + 12 % noch je eine schwächere bei einer um ca. $7^{o}C$ tieferen Temperatur.

Der deutliche Abfall des Ordnungsparamters läßt nach den Untersuchungen der genannten Autoren aufeine Phasenumwandlung in der Lipid-Phase von Dunaliella-Membranen schließen. Aufgrund der Lage des Nitroxid-Radikals im Stearinsäure-Label nahe der Carboxyl-Gruppe könnte neben einer erhöhten Beweglichkeit der CH_2-Kette auch auf eine "Auflockerung" der polaren Gruppen in der Lipid-Schicht geschlossen werden.

Vergleicht man die ermittelten Umwandlungstemperaturen mit dem temperaturabhängigen Anstieg der Saccharose-Synthese bei denselben NaCl-Konzentrationen, so wird deutlich, daß die Umwandlungstemperaturen etwa in der Mitte des sprunghaften Anstiegs der Saccharose-Synthese liegen. Zwischen der Sprungtemperatur der Saccharose-Synthese und der Phasenumwandlung einer Membran in Dunaliella besteht also offensichtlich ein deutlicher Zusammenhang.

Die Ergebnisse zur Glycerin-Ausscheidung der Zellen oberhalb der Sprungtemperatur (Abbildung 9) ergeben einen zusätzlichen Hinweis auf eine Struktur-, bzw. Permeabilitätsveränderung wohl hauptsächlich der Chloroplasten-Hüllmembran von Dunaliella.

Paralell zu einem plötzlichen Abfall des Glyceringehaltes der Zellen bei Temperaturerhöhung auf 40°C (siehe auch Abbildung 5) steigt der Glyceringehalt des Nährmediums stark an. Die Ausscheidungsrate steigt dabei bis auf das 5-fache des Wertes bei 25°C. Dieser Effekt kann nur durch eine temperaturbedingte Permeabilitätssteigerung der Chloroplasten-Hüllmembran erklärt werden, wenn man annimt, worauf die bisherigen Untersuchungen hindeuten, daß der Chloroplast der Ort der Glycerin-Synthese in Dunaliella ist.

4.6. Regulation der Saccharose-Biosynthese

Zusammenfassend können folgende wesentliche Erkenntnisse festgehalten werden:

a) Oberhalb einer von der NaCl-Konzentration des Nährmediums bestimmten Sprungtemperatur steigt die Saccharose-Synthese in Dunaliella bei Licht und Dunkel rapide an. Es werden Q_{10}-Werte von über 20 ermittelt.

b) Die Glycerinausscheidung der Zellen unterliegt einem ähnlichen Temperatureinfluß. Oberhalb der Sprungtemperatur steigt die Ausscheidungsrate auf das etwa 5-fache an.

c) Die enzymologischen Untersuchungen ergeben Hinweise für eine in vivo allosterische Regulation der Saccharose-P-Synthetase durch Fructose-6-P.

d) ESR-Messungen an Spin-markierten Zellen lassen auf Phasenumwandlungen der Lipid-Phase von Membranen in Dunaliella schließen, die im Bereich der jeweiligen Sprungtemperaturen der Saccharose-Synthese liegen.

Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man von folgendem Mechanismus für die thermische und (osmotische) Regulation der Saccharose-Bio-Synthese ausgehen:

Im Temperaturbereich unterhalb der Sprungtemperatur findet eine Minimalsynthese von Saccharose im Cytoplasma statt.

Die unter diesen Temperaturbedingungen aus den Chloroplasten exportierten Triosephosphate und PGA speisen vorwiegend die Stoffwechselkette der Glykolyse und den Citronensäurezyklus und führen zu den nach wenigen Sekunden Photosynthese schon markierten Verbindungen der Aminosäuren und Säuren des Citratzyklus. Die Saccharose-Synthese verläuft in Dunaliella unter suboptimalen Bedingungen, solange sie über die Aldolase- und FDP-ase-Reaktion gespeist wird.

Eine Steigerung der Temperatur über die Sprungtemperatur bewirkt durch eine Phasenumwandlung in der Lipid-Schicht der Chloroplasten-Hüllmembran eine stark erhöhte Permeabilität für Hexosephosphate, speziell F-6-P.

Durch die starke Zunahme der F-6-P-Konzentration im Cytoplasma erfolgt eine Aktivierung der Saccharose-P-Synthetase und es ergibt sich der nachgewiesene sprunghafte Anstieg der Saccharose-Synthese.

Die Temperaturerhöhung kann zusätzlich einen erhöhten ca. 2-fachen Substratumsatz am Enzym bewirken. Außerdem ermöglicht sie durch einen erhöhten Glycerin-Efflux aus dem Chloroplasten einen Anstieg der Glycerinkonzentration im Cytosol. Dies könnte aufgrund der Schutzwirkung des Glycerins auf Enzyme in Dunaliella bei Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (BOROWITZKA, BROWN, 1974), die man im Cytosol annehmen muß, gleichfalls zu einer weiteren Steigerung der Syntheserate führen.

Im Licht entstammt das für die Saccharose-Synthese verfügbar gemachte F-6-P vorwiegend der photosynthetischen CO_2-Fixierung.

Im Dunkeln wird das Hauptreservekohlenhydrat Stärke abgebaut. Durch die Temperaturerhöhung und die damit bedingte Permeabilitätsveränderung der Chloroplastenmembran erfolgt auch hier schon auf dem Niveau von F-6-P ein Austausch der Metaboliten zwischen Chloroplast und Cytoplasma.

Somit wäre die hohe Saccharose-Synthese im Licht wie im

Dunkeln auf denselben physikalischen Schaltprozeß in der Chloroplastenmembran zurückzuführen.

Auch im Licht wäre denkbar, daß ein gewisser Anteil des Hexosephosphats aus dem Stärkeabbau stammen könnte. Thermophile Hydrolasen sind bekannt (ROSE, 1961). Dadurch wäre auch die über 30 bis 35°C ansteigende Gesamtfixierungsrate und die trotz hoher Saccharose-Synthese gleichzeitig ansteigende Syntheserate für Glycerin zu erklären.

Über temperaturbedingte Permeabilitätsänderungen der Chloroplasten-Hüllmembran liegen bis heute keine Angaben vor. Es gibt jedoch Untersuchungen über die Permeabilität der Chloroplastenmembran für Hexosephosphate. Nach HEBER und WILLENBRINK (1964) und HEBER et al. (1967) erscheint markiertes F-6-P und G-6-P nach kurzer Photosynthesedauer im Cytoplasma. Versuche von BASSHAM et al. (1968) weisen dagegen auf eine geringe Permeabilität für F-6-P und G-6-P. hin.

Von SACKMANN et al. (1973) wurde in Escherichia coli - Membranen eine Übereinstimmung zwischen der Umwandlungstemperatur (Die mit Stearinsäure-Spin-Label bestimmt wurde) und den von OVERATH et al. (1971) nachgewiesenen Einbruch in der Temperaturabhängigkeit des ß-Galaktosid-Transportsystems gefunden. Durch die Phasenumwandlung wird ein abrupter Anstieg des ß-Galaktosid-Transportes hervorgerufen.

Es erscheint damit denkbar, daß eine Strukturveränderung in der Dunaliella-Chloroplasten-Membran ihre Eigenschaften in ähnlicher Weise drastisch verändern kann.

Der beobachtete osmotische Einfluß auf die Saccharose-Bio-Synthese könnte verschiedene Ursachen haben. Nach TRÄUBLE und EIBL (1974) können kleine Veränderungen im Ionenmilieu (pH-Wert, ein- und zweiwertige Kationen) große Veränderungen in der Struktur von künstlichen Lipid-Doppelschichten bewirken.

Für Dunaliella wäre denkbar, daß die mit steigender NaCl-Konzentration im Nährmedium ebenfalls steigende Ionenkonzentration der Zellen, bzw. des Cytoplasmas, wie es zumindest für die Na^+-Ionen zutrifft, einen stabilisierenden Einfluß auf die Chloroplasten-Membran ausüben kann.

Die bei der Optimaltemperatur beobachtete steigende Saccharose-Konzentration der Zellen bei zunehmender NaCl-Konzentration im Nährmedium könnte auf zwei Faktoren zurückgeführt werden.

Einerseits steigt mit zunehmender NaCl-Konzentration die CO_2-Fixierungsrate der Zellen relativ stark an (WEGMANN 1968, FRANK 1972), was zu einem erhöhten Substratangebot für die Saccharose-Synthese führen kann.

Andererseits wird die Glycerinsynthese in Dunaliella ebenfalls osmotisch reguliert (WEGMANN 1971, FRANK 1972). Da oberhalb der Sprungtemperatur die Glycerinausscheidung der Zellen (Chloroplasten) stark zunimmt, kann auch auf eine dadurch zusätzlich gesteigerte Glycerinkonzentration im Cytoplasma geschlossen werden.

Berechnet man aus der oberhalb der Sprungtemperatur maximal gefundenen Saccharose-Syntheserate die spezifische Aktivität der Saccharose-P-Synthetase, so kommt man auf 0,025 /uMol/Minute x mg Protein.
Sie liegt damit also bei etwa einem Drittel der des gereinigten Enzyms.

Daraus kann man schließen, daß das Enzym in vivo nicht unter optimalen Bedingungen arbeitet, möglicherweise aufgrund einer hohen Na^+-Konzentration im Cytoplasma. Nach der gemessenen NaCl-Hemmung des Enzyms würde man bei etwa 120 mM NaCl noch eine 30 %-ige Aktivität erhalten.

Eine bei hohen NaCl-Konzentrationen im Nährmedium besonders gesteigerte Glycerin-Konzentration im Cytoplasma könnte somit aufgrund seiner Schutzwirkung auf das Enzym, eine da-

durch sekundär gesteigerte Saccharose-Syntheserate hervorrufen.

Das folgende Stoffwechselschema faßt den angenommenen Regulationsprozeß zusammen.

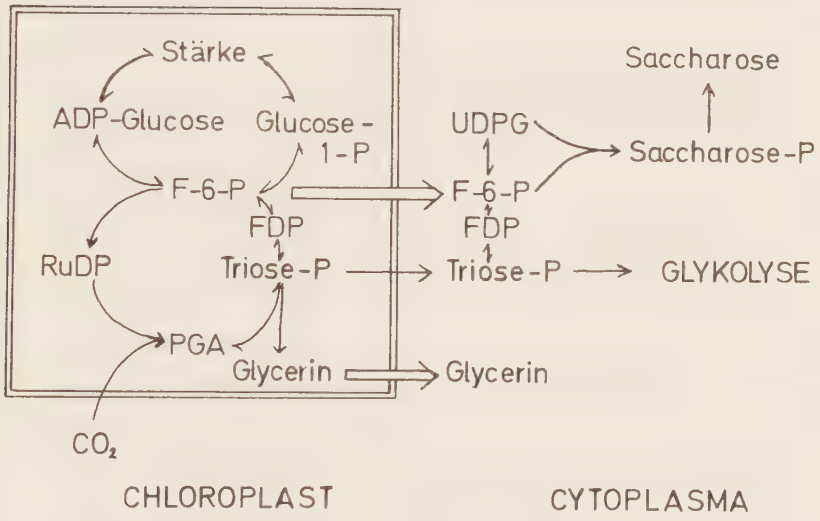


Abb. 32: Stoffwechsel-Schema zur thermischen Regulation der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella. Die dicken Pfeile geben die oberhalb der Sprungtemperatur stark erhöhte Durchlässigkeit der Chloroplasten-Hüllmembran für die betreffenden Metaboliten an.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Mit Hilfe der ^{14}C-Markierungstechnik und eines enzymatischen Saccharose-Tests wurden die physiologischen Bedingungen der Saccharose-Biosynthese erforscht.

Die Untersuchungen decken eine außergewöhnliche Abhängigkeit der Synthese-Rate von der Temperatur auf. Mit dem Überschreiten einer sogenannten Sprungtemperatur, die von der NaCl-Konzentration des Nährmediums abhängt, setzt ein schlagartiger Anstieg der Saccharose-Synthese im Licht wie im Dunkeln ein.

Der für diesen Prozeß ermittelte Temperaturkoeffizient (Q_{10}-Wert) liegt so hoch, daß daraus auf die Beteiligung physikalischer Strukturveränderungen geschlossen werden muß.

2.) Die Saccharose-P-Synthetase, das Hauptenzym der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella wurde isoliert und 10-fach gereinigt. Zur Stabilisierung der Enzympräparation ist eine bestimmte Phosphat-Konzentration notwendig. Unter diesen Bedingungen besitzt das gereinigte Enzym die maximale Aktivität und unterliegt einer allosterischen Regulation durch das Substrat Fructose-6-P. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der UDPG-Konzentration zeigt demgegenüber eine Michaelis-Menten-Kinetik.

Es wurden K_m-, bzw, $S_{0,5}$-Werte von 4,2 mM für UDPG und 0,9 mM für F-6-P ermittelt.

Das Temperaturoptimum der Enzymaktivität liegt bei 46°C. Eine Temperaturerhöhung um 10°C ergibt eine maximal 2,1-fache Steigerung der Reaktionsgeschwingigkeit.
Durch steigende NaCl-Konzentrationen wird das Enzym inaktiviert.

3.) ESR-Messungen an Spin-markierten Dunaliella-Zellen lassen auf thermische Phasenumwandlung der Lipid-Schicht einer Dunaliella-Membran schließen. Die bestimmten Umwandlungstemperaturen sind von der NaCl-Konzentration des Nährmediums abhängig.

Mögliche Permeabilitätsänderungen dieser Membran, die durch solche Strukturveränderungen ausgelöst werden können, werden in Verbindung mit der Sprungtemperatur der Saccharose-Synthese, der paralell dazu gesteigerten Glycerinausscheidung der Zellen und den Eigenschaften der Saccharose-P-Synthetase diskutiert.

Die Befunde lassen den Schluß zu, daß die Saccharose-Biosynthese in Dunaliella über thermisch und osmotisch gesteuerte Permeabilitätsveränderungen der Chloroplasten-Hülle reguliert wird.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BASSHAM, J.A., KIRK, M., JENSEN, R.G.: Photosynthesis by isolated chloroplasts. I. Diffusion of labelled photosynthetic intermediates between isolated chloroplasts and suspending medium.
Biochim. Biophys. Acta 153, 211-218 (1968)

BASSHAM, J.A.: Controll of the photosynthetic carbon metabolism.
Science 172, 526-534 (1971)

BIRD, I.F., PORTER, H.K., STOCKING, C.R.: Intracellular lokalisation of enzymes associated with sucrose synthesis in leaves.
Biochim. Biophys. Acta 100, 366-375 (1965)

BIRD, I.F., CORNELIUS, M.J., DYER, T.A., KEYS, A.J.: The purity of chloroplasts isolated in non-aqueous media.
J. Exp. Botany 24, 211-215 (1973)

BIRD, I.f., CORNELIUS, M.J., KEYS, J., WHITTINGHAM, C.P.: Intracellular site of sucrose synthesis in leaves.
Phytochemistry 13, 59-64 (1974)

BOROWITZKA, L.J., BROWN, A.D.: The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, Dunaliella. The role of glycerol as a compatible solute.
Arch. Microbiol. 96, 37-52 (1974)

CARDINI, C.E., LELOIR, L.F., CHIRIBOGA, J.: The biosynthesis of sucrose.
J. Biol. Chem., 214, 149-156 (1955)

CHAPMAN, D.: The structure of lipids. London: Methuen, 1965

CRAIGIE, J.S., MC LACHLAN, J.: Glycerol as a photosynthetic product in Dunaliella tertiolecta Butcher.
Can. J. Bot. 42, 777-778 (1964)

CRAIGIE, J.S., MC LACHLAN, J., MAJAK, W., ACKMAN, R.G., TOCHER,C.s.: Photosynthesis in algae. II. Green algae with special refernce to Dunaliella ssp. and tetraselmis spp.
Can. J. Bot. 44, 1247-1254 (1966)

DELMER, D.P.: The purification and properties of sucrose synthetase from etiolates Phaseolus aureus seedlings.
J. Biol. Chem. 247, 3822-3828 (1972)

EVERSON, R.G., COCKBURN, W., GIBBS, M.: Sucrose as a product of photosynthesis in isolates spinach chloroplasts.
Plant Physiol. 42, 840-844 (1967)

FEKETE, M.A.R.DE: The regulative properties of UDPG: D-Fructose-6-phosphate-2-Glucosyltransferase (Sucrose Phosphate Synthetase) from Vicia faba cotyledons
Eur. J. Biochem. 19, 73-80 (1971)

FRANK, G.: Physiologie und Biochemie der Glycerinsynthese in Dunaliella tertiolecta.
Dissertation, Tübingen 1972

GRIMES, W.J., JONES, B.L., ALBERSHEIM, P.: Sucrose synthetase from Phaseolus aureus seedlings.
J. Biol. Chem. 245, 188-197 (19707

HAQ, S., HASSID, W.Z.: Biosynthesis of sucrose phosphate with sugar cane leaf chloroplasts.
Plant Physiol. 40, 591-594 (1965)

HEBER, U., SANTARIUS, K.A., HUDSON, M.A., HALLIER, U.W.: Intrazellulärer Transport von Zwischenprodukten der Photosynthese im Photosynthese-Gleichgewicht und im Dunkel-Licht-Wechsel.
Z. Naturforsch. 22b, 1189-1199 (1967)

HEBER, U., WILLENBRINK, J.: Sites of synthesis and transport of photosynthetic products within the leaf cell.
Biochem. Biophys. Acta 82, 313-324 (1964)

HELDT, H.W., SAUER, F.: The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transport.
Biochim. Biophys. Acta 234, 83-91 (1971)

HUBBELL, W.L., MC CONNELL, H.M.: Spin-Label studies of the excitable membranes of nerve and muscle.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61, 12-16 (1968)

HUBBELL, W.L., MC CONNELL, H.M.: Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes.
J. Amer. Chem. Soc. 93, 314-326 (1971)

KEITH, A.D., SHARNOFF, M., COHN, G.E.: A summary and evaluation of spin labels used as probes for biological membrane structure.
Biochim. Biophys. Acta 300, 379-419 (1973)

KELLY, G.J., LATZKO, E.: Evidence for phosphofructokinase in chloroplasts
Nature 256, 429-430 (1975)

KELLY, G.J., LATZKO, E., GIBBS, M.: Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 181-205 (1976)

LARSON, C., ALBERTSSON, P.-A.: Photosynthetic $^{14}CO_2$ fixation by chloroplast populations isolated by a polymer two-phase technique.
Biochim. Biophys. Acta 357, 412-419 (1974)

LATZKO, E., ZIMMERMANN, G., FELLER, U.: Evidence for a hexose-diphosphatase from the cytoplasm of spinach leaves.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 321-326 (1974)

LELOIR, L.F., CARDINI, C.E.: The biosynthesis of sucrose phosphate.
J. Biol. Chem. 214, 157-165 (1955)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MAURER, H.J.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.
Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1971

MC CONNELL, H.M., MC FARLAND, B.G.: Physics and chemistry of spin labels.
Quart. Rev. Biophys. 3, 91-136 (1970)

MENDICINO, J.: Sucrose phosphate synthesis in wheat germ and green leaves.
J. Biol. Chem. 235, 3347-3352 (1960)

METZNER, H.: Papierchromatographische Trennung der Photosynthese-Intermediärprodukte.
Naturwissenschaften 49, 183 (1962)

METZNER, H., RAU, H.-J., SENGER, H.: Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit einzelner Pigmentmangelmutanten von Chlorella.
Planta 65, 186-194 (1965)

MILLER, R.W., DE LA ROCHE, I.A.: Properties of spin labelled membranes of Fusarium oxysporium. Biochim. Biophys. Acta 443, 64-80 (1976)

MORGENTHALER, J.-J., PRICE, C.A., ROBINSON, J.M., GIBBS, M.: Photosynthetic activity of spinach chloroplasts after isopycnic centrifugation in gradients of silica. Plant Physiol. 54, 532-534 (1974)

MURATA, T.: Sucrose phosphate synthetase from various plant origins. Agr. Biol. Chem. 36, 1877-1884 (1972)

NIKAIDO, H., TAKEUCHI, Y., OHNISHI, S.-I., NAKAE, T.: Outer membrane of Salmonella typhimurium. Electron spin resonance studies. Biochim. Biophys. Acta 465, 152-164 (1977)

NOMURA, T., AKAZAWA, T.: Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. V. Sucrose phosphate synthetase in the scutellum. Plant Cell Physiol. 15, 477-483 (1974)

OVERATH, P., HILL, F.F., LAMNEK-HIRSCH, I.: Biogenesis of E. coli membrane: Evidence for randomization of lipid phase. Nature New Biol. 234, 264-267 (1971)

PREISS, J., GREENBERG, E.: Allosteric regulation of Uridine Diphosphoglucose: D-Fructose-6-phosphate-2-Glucosyltransferase (E.C.2.4.1.14) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 289-295 (1969)

ROE, J.H.: A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. J. Biol. Chem. 107, 15-22 (1934)

ROSE, A.H.: Alcoholic Fermentation, In: Industrial Microbiology, Butterworths: London 1961, S. 120

SACKMANN, E., TRÄUBLE, H., GALLA, H.-J., OVERATH, P.: Lateral diffusion, protein mobility and phase transitions in Escherichia coli membranes. A spin label study. Biochemistry 12, 5360-5369 (1973)

SCHÜRMANN, P.: Seperation of phosphate esters and algal extracts by thin-layer electrophoresis and chromatographie.
J. Chromatogr. 39, 507-509 (1969)

SEELIG, J.: Spin label studies of oriented smectica liquid crystals. A model system for biomembranes.
J. Amer. Chem. Soc. 92, 3881-3887 (1970)

SHEPHARD, D.C., BIDWELL, R.G.S.: Photosynthesis and carbon metabolism in a chloroplast preperation from Acetabularia.
Protoplasma 76, 289-307 (1973)

SLABNIK, E., FRYDMAN, R.B., CARDINI, C.E.: Some properties of Potato tuber UDPG: D-Fructose-2-glycosyltransferase (E.C.2.4.1.14) and UDPG: D-Fructose-6-phosphat-2-glucosyltransferase (E.C.2.4.1.13)
Plant Physiol. 43, 1063-1068 (1968)

SNYDER, F.: Radioassay of thin-layer chromatogramms: A high-resolution zonal scrapar for quantitative ^{14}C and ^{3}H scanning of thin-layer chromatogramms.
Anal. Biochem. 9, 183-196 (1964)

STEWART, W.D.P.: Algal Physiologie and Biochemistry.
Blackwell Sci. Publ. Oxford, 1974

TRÄUBLE, H.: Phasenumwandlungen in Lipiden. Mögliche Schaltprozesse in biologischen Membranen.
Naturwissenschaften 6, 277-284 (1971)

TRÄUBLE, H., EIBL, H.-J.: Electrostatic effects on lipid phase transitions: Membrane structure and ionic environement.
Proc. Nat. Acad. Sci- USA 71, 214-219 (1974)

TREZZI, F., GALLI, M.G., BELLINI, E.: L'osmoresistenza di Dunaliella salina. Richerche ultrastrutturali.
Giorn. Bot. Ital. 72, 255-263 (1965)

WEGMANN, K.: Der Weg des Kohlenstoffs bei der Photosynthese und Dunkelfixierung in Dunaliella spec.
Dissertation, Tübingen 1968

WEGMANN, K.: Osmotic regulation of photosynthetic glycerol production in Dunaliella.
Biochim. Biophys. Acta 234, 317-323 (1971)

WINKENBACH, F., GRANT, B.R., BIDWELL, R.G.S.: The effects of nitrate, nitrite, and ammonia on photosynthetic carbon metabolism of Acetabularia chloroplast preperations compared with spinach chloroplasts an whole cells of Acetabularoa and Dunaliella.
Can. J. Bot. 50, 2545-2551 (1972)

L E B E N S L A U F

Am 21. Januar 1949 wurde ich, Werner Müller, als 2. Kind des Stadtgärtnermeisters Hermann Müller und seiner Ehefrau Marianne, geb. Kraft in Nagold/Schwarzwald, geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Nagold und von 1959 bis 1967 das Gymnasium in Nagold.
Die Reifeprüfung legte ich am 14. Juni 1967 ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Biologiestudium an der Universität Hohenheim.
Zum Sommersemester 1969 wechselte ich an die Universität Tübingen über und legte hier am 21. April 1970 die Vordiplomprüfung ab.
Mit der Hauptdiplomprüfung am 10. Juni 1974 schloß ich das Biologiestudium ab. Die Diplomarbeit: "Aufnahme von Ammonium-Ionen und deren Einfluß auf den Primärstoffwechsel von Dunaliella" fertigte ich vom August 1973 bis Juni 1974 am Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen unter der Leitung von Universitätsdozent Dr. K. Wegmann.

Vom August 1974 bis Mai 1977 arbeitete ich an der Dissertation: "Die thermische und osmotische Regulation der Saccharose-Biosynthese in Dunaliella", unter der Leitung von Universitätsdozent Dr. K. Wegmann.

Seit 6. August 1976 bin ich mit Irmtraud, geb. Bosch verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

In Hohenheim: Bayreuther, Beckmann, Beug, Bruchmann, Frenzel, Hahn, Heß, Lingens, Mechelke, Rentschler, Siebert.

In Tübingen: Ammermann, Bünning, Guglielmi, Harder, Metzner, Möhres, Neuweiler, Oelkrug, Schweizer, Wegmann, Weitzel, Varju.

Druck: Reprografik E. Müllerbader
Forststrasse 18
7024 Filderstadt 4 (Plattenhardt)
Telefon (0711) 77 15 67